

Aus der Abteilung für Pneumologie des Zentrums für Innere Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. Virchow

**Charakterisierung von Oberflächenmarkern dendritischer Zellen
unter der in-vitro-Stimulation mit Immunglobulinen im peripheren
Blut von Patienten mit COPD**

Eine klinisch - experimentelle Studie

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

[Dr. med.]

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock



von Janne Didt aus Hamburg

Rostock, Januar 2021

Dekan: Prof. Dr. med. univ. E. C. Reisinger

Gutachter:

1. Prof. Dr. M. Lommatzsch
Universitätsmedizin Rostock
Abteilung für Pneumologie
2. Prof. Dr. B. Müller-Hilke
Universitätsmedizin Rostock
Institut für Immunologie
3. Prof. Dr. R. Koczulla
Schön Klinik Berchtesgardener Land
Fachzentrum für Pneumologie

Datum der Verteidigung: 1. September 2021

Note: magna cum laude

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	1
1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.3	Symptomatik und Klinik.....	4
1.1.4	Diagnostik	5
1.1.5	Therapie.....	7
1.2	Myeloide dendritische Zellen	9
1.2.1	Entdeckung der dendritischen Zelle.....	10
1.2.2	Herkunft.....	10
1.2.3	Subpopulationen	11
1.2.4	Antigenerkennung und -prozessierung	13
1.2.5	Migration	14
1.2.6	Zellaktivierung	14
1.2.7	Dendritische Zellen und COPD	15
1.3	Immunglobuline	17
1.3.1	Aufbau und Produktion der Immunglobuline	17
1.3.2	Effektormechanismen der Immunglobuline	18
1.4	Fragestellungen	19
2	PATIENTEN, MATERIAL, METHODEN.....	20
2.1	Studiendesign	20
2.1.1	Probanden	20
2.1.2	Studienablauf	21
2.2	Lungenfunktionsuntersuchung	21
2.3	Gewinnung der Blutproben.....	23
2.4	Labordiagnostik	24
2.5	Aufreinigung der Leukozyten	25
2.5.1	Isolation der peripheren mononukleären Zellen (PBMC)	25
2.5.2	Isolation der myeloiden dendritischen Zellen.....	28
2.6	Reinheitskontrolle mittels Durchflusszytometrie.....	30
2.7	Zellkultur und Stimulation der myeloiden dendritischen Zellen.....	32
2.8	Durchflusszytometrie	35
2.9	Statistische Auswertung.....	41

3	ERGEBNISSE	43
3.1	Klinische Studie	43
3.1.1	Charakterisierung der Studienpopulation	43
3.1.2	Klinische Chemie und Lungenfunktionsdiagnostik	44
3.1.3	Immunglobulindiagnostik	45
3.1.4	Vergleich der Expression von CD32 und CD64 auf mDC zwischen den Gruppen	45
3.1.5	Korrelationsanalysen	47
3.2	Zellkulturstudie	49
3.2.1	Charakterisierung der Studienpopulation	49
3.2.2	Klinische Chemie und Lungenfunktionsdiagnostik	50
3.2.3	Zellstimulation	52
4	DISKUSSION	59
4.1	Validität der untersuchten Probandengruppen	59
4.2	Methodenkritik	61
4.3	Immunglobulin G im Serum bei der COPD	62
4.4	Immunglobulin-Rezeptoren bei der COPD	66
4.4.1	Mögliche Bedeutung von CD32 als IgG-Rezeptor bei der COPD	66
4.4.2	Mögliche Bedeutung von CD32 für die Regulation von bestimmten Oberflächenmarkern bei der COPD	67
4.4.3	Mögliche Bedeutung von CD32 als CRP-Rezeptor bei der COPD	69
4.5	Hypothese	71
5	ZUSAMMENFASSUNG	73
6	LITERATURVERZEICHNIS	74
7	ANHANG	91
7.1	Abkürzungsverzeichnis	91
7.2	Abbildungsverzeichnis	93
7.3	Tabellenverzeichnis	93
8	THESEN	94
9	CURRICULUM VITAE	96
10	DANKSAGUNG	97
11	PERSÖNLICHE ERKLÄRUNG	98

1 EINLEITUNG

1.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine weit verbreitete, häufig vermeidbare Erkrankung, die mit Einschränkungen des pulmonalen Gasaustausches und persistierenden respiratorischen Beschwerden einhergeht. Die Minderung des Luftflusses entwickelt sich auf Grundlage einer chronischen Entzündung der kleinen Atemwege sowie durch fortschreitende Destruktion des Lungenparenchyms mit Überblähung (Emphysem). Der Begriff Emphysem ist anatomisch-pathologischer Herkunft und wird des Öfteren auch im klinischen Kontext zur Quantifizierung der lungenfunktionell messbaren Überblähung verwendet. Das Emphysem ist charakterisiert durch die Zerstörung der Alveolarwände und einer damit einhergehenden Reduktion der pulmonalen Gasaustauschfläche. Im Verlauf kommt es zur irreversiblen Erweiterung distal der terminalen Bronchiolen. Zentrales, lungenfunktionelles Merkmal der COPD ist die progrediente Obstruktion der Atemwege, die durch Medikamente nur teilweise bzw. nicht reversibel ist. [1, 2]

Die Abgrenzung zu anderen obstruktiven Ventilationsstörungen spielt im klinischen Alltag eine entscheidende Rolle. Hier ist neben selteneren Erkrankungen wie der Mukoviszidose und der Sarkoidose in erster Linie das Asthma bronchiale zu nennen, welches aus ätiologischer, therapeutischer und prognostischer Sicht von der COPD zu unterscheiden ist. [3]

Die COPD wird in ihrem Schweregrad maßgeblich durch extrapulmonale Begleiterkrankungen beeinflusst. Hierzu zählen unter anderem Skelettmuskeldysfunktionen und Muskelabbau, Gewichtsverlust und Kachexie, kardiovaskuläre und metabolische Komplikationen sowie Osteoporose. [4]

1.1.1 Epidemiologie

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung ist weltweit eine der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität [5, 6]. Sie stellt eine maßgebliche soziale und ökonomische Belastung dar, deren Tendenz steigt [7].

Im Rahmen der Global Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) - Studie wurde der bisher umfangreichste Versuch unternommen, die Prävalenz der Erkrankung ab dem 40. Lebensjahr zu erfassen. Die Standards orientieren sich an der Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) - Leitlinie und sehen spirometrische Untersuchungen vor und nach Gabe eines Bronchodilatators vor [8]. Die hierbei bisher ermittelten Prävalenzen deuten im Vergleich zu bereits veröffentlichten Daten darauf hin, dass mehr Menschen von einer Lungenfunktionseinschränkung betroffen sind als bisher angenommen. Demnach würde die Prävalenz der COPD (\geq spirometrischer Grad 2) unter Männern bei 11,8 % und unter Frauen bei 8,5 % liegen [9]. Unter den Nierauchern sei der Anteil der Betroffenen bei einem beträchtlichen Prozentsatz von 3-11 % [9].

Laut der aktuellen Ausgabe des Weißbuches Lunge von 2014 geht man davon aus, dass etwa 10-12 % der deutschen Bevölkerung im Alter von über 40 Jahren an der COPD leiden [10].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Genese der COPD wird auf eine Interaktion zwischen genetischer Veranlagung und Umwelteinflüssen zurückgeführt [11]. In mehr als 90 % der Fälle sieht man die Ursache für die Krankheitsentwicklung in der Exposition der Betroffenen mit inhalativen Noxen [12]. In den westlichen Industrienationen ist das Hauptrisiko hierfür das aktive Rauchen, gefolgt von der Passivrauch-Exposition und beruflichen Schadstoffbelastung [13, 14]. Während die Raucherzahlen in Ländern wie Deutschland, Großbritannien und der USA sinken, zeigt sich in Niedrigeinkommensländern ein Aufwärtstrend, vor allem unter Frauen und Jugendlichen [15]. Berufsbedingter Kontakt mit organischen und anorganischen Stäuben, Abgasen und Chemikalien gilt als unterschätzter Risikofaktor [16, 17].

Zu den Hauptursachen für die Entstehung einer COPD in Entwicklungsländern zählt die häusliche Schadstoffbelastung, wie sie zum Beispiel durch das Kochen am offenen Feuer entsteht

[18, 19]. Weltweit gewinnen beinahe 3 Milliarden Menschen Energie zum Heizen und Kochen über die Verbrennung von Holz und Kohle [20].

Einen Hinweis auf den Einfluss genetischer Prädisposition geben Studien, deren Ergebnissen zufolge weniger als 50 % der Raucher in ihrem Leben an COPD erkranken [21] und auch Nieraucher in seltenen Fällen eine COPD bekommen können [9]. In jüngster Zeit hat sich die Annahme über das Geschlechterverhältnis der Erkrankung in Industrieländern verändert. Männer weisen demnach keine weitaus höhere, sondern beide Geschlechter eine annähernd gleiche Prävalenz der COPD auf [22, 23]. Es bleibt kontrovers, ob das Erkrankungsrisiko unter Frauen bei vergleichbarem Tabakkonsum womöglich sogar größer ist [24, 25]. Auch das steigende Alter stellt einen eigenständigen Risikofaktor dar [13, 23].

Der bekannteste genetische Risikofaktor ist der hereditäre Mangel des Alpha-1-Antitrypsins, eines Proteaseinhibitors. Vor allem die unzureichende Hemmung der Neutrophilenelastase führt zur Proteolyse des Lungengerüsts [26]. Auch wenn es hier ohne aktives Rauchen zur Entwicklung eines Emphysems kommt, wird der Lungenfunktionsverlust und die Schwere des Krankheitsbildes durch das gleichzeitige Rauchen rapide beschleunigt [27].

Die andauernde Exposition gegenüber Zigarettenrauch oder anderen Luftschadstoffen verursacht eine unphysiologische, bronchopulmonale Entzündungsreaktion [28]. Der zugrundeliegende Pathomechanismus ist sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern bis dato nicht vollständig verstanden. Bereits Minuten oder Stunden der Exposition führen zu inflammatorischen Prozessen in der Lunge [29]. Diese sind für gewöhnlich physiologisch und vorübergehend, führen jedoch im Zuge der chronischen Entzündung bei andauernder Exposition zu pathologischen Veränderungen [30]. Derartige Veränderungen betreffen die Atemwege, das Lungenparenchym sowie die pulmonalen Gefäße [31] und gehen mit einem Anstieg inflammatorischer Zellen einher. Zu ihnen zählen Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten, T-Lymphozyten und innate lymphoide Zellen [32]. Sie sezernieren multiple proinflammatorische Mediatoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine [32]. Das zytotoxische Potenzial CD8-positiver T-Lymphozyten assoziiert bzw. steigt mit dem Schweregrad der Erkrankung [33]. Es ist bekannt, dass oxidativer Stress und ein Überschuss an Proteinasen die Entzündungsreaktion begünstigen [32, 34, 35]. Induziert durch Wachstumsfaktoren [36, 37], Entzündungsprozesse und den fortlaufenden Wechsel aus Gewebeschädigung und -reparatur

kommt es zur Entwicklung eines Emphysems und zum fibrotischen Umbau der kleinen Atemwege [2, 38]. Resultate dieser pathologischen Veränderungen sind der Verlust bzw. die Verengung der peripheren Luftwege [39], die progressive Störung der Ventilation, die Lungenüberblähung und der eingeschränkte pulmonale Gasaustausch. Weiterhin werden eine glanduläre Hypertrophie mit vermehrter Mukusproduktion, eine unspezifische Hyperreagibilität des Bronchialbaums und die Dysfunktion der mukoziliären Clearance als typische Charakteristika beschrieben [40].

In diversen Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine chronische systemische Entzündung womöglich das Bindeglied zwischen der COPD und seinen Komorbiditäten darstellt [41, 42]. Demnach könnten Mediatoren, die in der Lunge von Erkrankten nachgewiesen wurden, ebenfalls im Blutkreislauf in erhöhter Konzentration vorhanden sein und Erkrankungen auslösen bzw. verschlechtern, die ihrerseits mit einer systemischen Entzündung assoziiert sind [32]. Hierzu zählt man unter anderem die ischämische Herzerkrankung, die arterielle Hypertonie, den Diabetes mellitus und die Osteoporose [32, 43].

1.1.3 Symptomatik und Klinik

Der COPD geht in der Mehrheit der Fälle eine nicht obstruktive Bronchitis voraus. Der frühzeitig auftretende Husten wird von Patienten häufig als Raucherhusten verharmlost und für eine unvermeidbare, aber banale Folge des Tabakkonsums gehalten. Nachdem er zu Beginn unregelmäßig auftritt, entwickelt er sich im Laufe der Zeit zu einer andauernden Belastung für die Betroffenen. Etwa 30 % der Patienten haben produktiven Husten [2]. Untersuchungen haben ergeben, dass die Belastungsdyspnoe - das Kardinalsymptom der COPD - ebenfalls schon in früheren Stadien der Erkrankung auftreten kann [44]. Nachdem sich die Dyspnoe zunächst nur bei körperlicher Betätigung zeigt, können Betroffene in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung bereits in Ruhe kurzatmig sein. Hier spielen auch Kraftlosigkeit und Anorexie eine prognostisch wegweisende Rolle [45, 46]. Weitere Charakteristika sind das Engegefühl in der Brust und Geräusche bei der Ausatmung (Giemen). Viele Patienten berichten über die Variabilität der Symptome im Tagesverlauf und geben an, dass die Beschwerden in den Morgenstunden am stärksten seien [47–49].

Im natürlichen Verlauf der Erkrankung kann es wiederholt zu Exazerbationen kommen. Diese werden als akute, behandlungsbedürftige Verschlechterung der respiratorischen Symptomatik definiert [50, 51]. Sie zeichnen sich in erster Linie durch eine Zunahme der Dyspnoe aus und gehen regelhaft mit einem Lungenfunktionsverlust einher. Hauptsächlich für Exazerbationen sind virale Infektionen. Aber auch bakterielle Infektionen, Luftverschmutzung oder feucht-kalte Witterung können Triggerfaktoren darstellen [52].

1.1.4 Diagnostik

Die deutsche S2k-Leitlinie zur COPD empfiehlt die gezielte Untersuchung von Patienten, die typische Symptome wie Dyspnoe, chronischen Husten sowie vermehrte Sputumproduktion aufweisen und gegenüber Risikofaktoren der COPD exponiert waren. Laut der GOLD-Leitlinie bestätigt ein Tiffeneau-Index – das Verhältnis der beiden spirometrischen Parameter Einsekundenkapazität (FEV1) und forcierte Vitalkapazität (FVC) – von kleiner als 0,70 nach Inhalation eines kurzwirksamen Bronchodilatators das Vorhandensein einer COPD. In der deutschen Leitlinie zur Spirometrie hingegen spricht man sich für die Verwendung der unteren Normgrenze (lower limit of normal, LLN) des Tiffeneau-Index als Obstruktions-Kriterium aus. Diese wurde als das 5. Perzentil des Tiffeneau-Index definiert. Folglich weisen 5 % der gesunden Bevölkerung einen Messwert unterhalb des LLN und somit einen pathologischen Tiffeneau-Index auf. Die Autoren der deutschen Spirometrie-Leitlinie argumentieren, dass das LLN Menschen mit einer Obstruktion besser identifizieren kann. Beispielsweise ist der Tiffeneau-Index altersabhängig, das LLN kann bei einem 90-jährigen Patienten bei 0,60 liegen [3]. Der GOLD-Initiative zufolge gibt es keine Langzeitstudien, die die Nutzung des LLN bestätigen können. Das Risiko einer Fehldiagnose und Überbehandlung einzelner Patienten sei begrenzt, da die Diagnose in Kontext mit der oben erwähnten Symptomatik und der Exposition zu Schadstoffen gestellt wird. Weiterhin argumentiert GOLD, dass ein fester Prozentwert die im klinischen Alltag notwendigen Attribute wie Einfachheit und Beständigkeit gewährleisten könnte. Die neue deutsche COPD-Leitlinie entschied sich, beide Möglichkeiten ($FEV1/FVC < 0,7$ oder $FEV1/FVC < LLN$) als Obstruktions-Kriterium für die Diagnose der COPD zu erlauben. [2, 3]

Sowohl die Verfasser der deutschen COPD-Leitlinie als auch die GOLD-Initiative sehen die Ziele des COPD-Assessments in der Klassifizierung der Ventilationsstörung und ihres Einflusses auf

den Gesundheitszustand des Patienten. Darüber hinaus soll auch die Risikoeinschätzung zukünftiger Ereignisse wie Exazerbationen und Krankenhauseinweisungen bei der Therapieeinstellung berücksichtigt werden. Um diesen Anforderungen an ein Assessment gerecht zu werden, wurde sowohl eine spirometrische als auch eine klinische Einteilung entwickelt. [2, 3]

Die spirometrische Schweregradeinteilung erfolgt, wie in Tabelle 1-1 dargestellt, anhand postbronchodilatatorischer FEV1-Werte.

Tab. 1-1: Schweregrad der Obstruktion bei COPD nach GOLD
modifiziert nach [2]

Schweregrad	FEV1 (% vom Soll), postbronchodilatatorisch
GOLD 1	≥ 80
GOLD 2	50 – 79
GOLD 3	30 – 49
GOLD 4	< 30

Studien zeigten, dass sich signifikante Ventilationsstörungen ohne das Vorhandensein von Symptomen entwickeln [53] und chronisch respiratorische Beschwerden auch ohne spirometrische Veränderungen auftreten können [54, 55]. Zur Einschätzung der symptombezogenen Belastung der Patienten werden derzeit überwiegend zwei standardisierte Tests eingesetzt. Der Modified Medical Research Council (mMRC) - Fragebogen graduert die Schwere der Dyspnoe des Patienten [56] und korreliert diese mit dem künftigen Sterblichkeitsrisiko [57, 58]. Für ein umfangreicheres Assessment des Gesundheitszustandes, das über die alleinige Beurteilung der Atemnot hinausgeht, wurde der COPD Assessment Test (CAT) entwickelt. Bei diesem beurteilen Patienten die Stärke von acht Symptomen mit jeweils maximal fünf Punkten, sodass ein Höchstwert von 40 Punkten erreicht werden kann [59]. Die acht bewerteten Items sind Husten, Schleim, Engegefühl in der Brust, Belastungsdyspnoe, Einschränkung der Alltagsaktivität, Bedenken beim Verlassen des Hauses, Schlaf und Energie [60].

Um die Diagnostik zu vervollständigen, legt man eine Evaluation des Exazerbationsrisikos nahe. Die Spirometrie bleibt essentiell für die Diagnosestellung, findet allerdings keinen Ein-

gang in die ABCD-Klassifikation nach GOLD, einer rein klinischen Einteilung. Die Patientengruppen werden ausschließlich aus den Ergebnissen der Symptomfragebögen und der Exazerbationsanamnese der Betroffenen abgeleitet. [2]

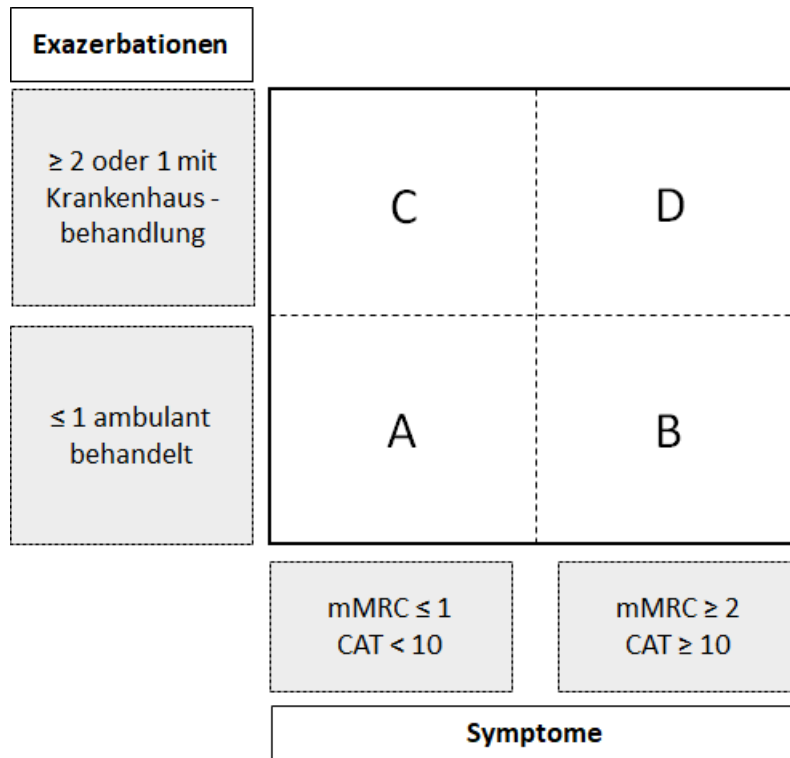


Abb. 1-1: ABCD-Klassifikation der COPD
modifiziert nach [3]

1.1.5 Therapie

Das Hauptziel der Therapie der COPD ist die Reduktion der Symptome und des Risikos künftiger Exazerbationen. Obwohl Diagnose und Schweregrade der COPD vorwiegend auf Ergebnissen spirometrischer Untersuchungen basieren, suchen Patienten medizinische Hilfe in der Praxis meist infolge des symptombedingt eingeschränkten Funktionsstatus auf. Daher orientieren sich die Empfehlungen zur Pharmakotherapie an der klinisch-basierten ABCD-Klassifikation (s. Kapitel 1.1.4) [2, 3]. Langwirksame, inhalative Bronchodilatoren (Beta-2-Sympathomimetika, Anticholinergika) stellen in der Dauertherapie die Basismedikamente zur Reduktion und Prävention von Symptomen dar. Eine zusätzliche Therapie mit inhalativen Glu-

kokortikoiden (ICS) soll erwogen werden, wenn trotz adäquater Behandlung mit langwirksamen Bronchodilatoren Exazerbationen auftreten. Eine Bluteosinophilenvermehrung unterstützt diese Entscheidung. Im Falle weiterhin persistierender Symptome einer chronischen Bronchitis und schwerer Atemflusslimitierung können Krankenhausaufenthalte aufgrund von Exazerbationen durch den zusätzlichen Einsatz von Roflumilast reduziert werden. [3]

Medikamentöse Therapie		
	Symptome (Ausmaß der Lungenfunktionseinschränkung berücksichtigen)	
GOLD Gruppe A	wenig (CAT < 10)	<ul style="list-style-type: none">- Keine- SABA/ SAMA (initial)- LABA oder LAMA
GOLD Gruppe B	viel (CAT ≥ 10)	<ul style="list-style-type: none">- LABA oder LAMA- LABA + LAMA
Exazerbationen > 1 oder Exazerbation mit Hospitalisierung		
GOLD Gruppen C und D	nicht vorbehandelt	<ul style="list-style-type: none">- LAMA oder LAMA + LABA
	vorbehandelt	<pre>graph TD; A[LABA + ICS] --> D[LABA + LAMA + ICS]; B[LABA + LAMA] --> D;</pre>
	Eskalation/Wechsel	
		<p>± Roflumilast (Phänotyp chron. Bronchitis)</p>

Abb. 1-2: Stufentherapie bei COPD
modifiziert nach [3]

Ziel der pharmakologischen Therapie ist die Minderung der Symptome, die Reduktion von Häufigkeit und Schwere der Exazerbationen sowie die Verbesserung der Belastungstoleranz und des Gesundheitszustandes. Der Behandlungsplan beschränkt sich nicht nur auf die Pharmakotherapie, sondern sollte durch entsprechende nichtmedikamentöse Behandlungsansätze ergänzt werden. Allen voran steht die Tabakentwöhnung. Sie hat das größte Potenzial, den natürlichen Verlauf der Erkrankung zu beeinflussen. Weitere Präventivmaßnahmen sind die Influenza- und Pneumokokkenschutzimpfung [3]. Erstere führte im Vergleich zur Placebogruppe zu einer signifikanten Reduktion der Exazerbationsrate [61]. Die Vermittlung von

Informationen über die COPD und das Therapiekonzept sowie die Beratung zur gesunden Lebensführung bezüglich Ernährung und körperlicher Betätigung werden in den Leitlinien ebenso empfohlen wie Schulungen zum Selbstmanagement der Erkrankung und Rehabilitationsmaßnahmen. Hier werden unter anderem die korrekte Inhalationstechnik demonstriert, das adäquate Verhalten im Falle einer Exazerbation besprochen und den Patienten Strategien aufgezeigt, die Luftnot zu reduzieren. [2]

1.2 Myeloide dendritische Zellen

Im Rahmen der COPD infiltrieren Immun- und Entzündungszellen wie Makrophagen, Neutrophile, T-Lymphozyten und dendritische Zellen die Atemwege. Während die Rolle der Makrophagen, Neutrophilen und T-Lymphozyten gut charakterisiert werden konnte, ist der Beitrag dendritischer Zellen zur Pathogenese der COPD wenig verstanden. [62]

Dendritische Zellen stellen eine heterogene Gruppe antigenpräsentierender Zellen dar, die sowohl im Stande sind, immunologische Abwehrreaktionen gegen Pathogene einzuleiten als auch die Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen zu fördern. Trotz der Fähigkeit zur Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation an T-Lymphozyten, die allen dendritischen Zellen gemein ist, unterscheiden sie sich hinsichtlich Lokalisierung, Migrationsmustern, Oberflächenmarkern und Zytokinproduktion. Aufgrund ihres Potenzials zur T-Zell-Aktivierung, die ihrerseits in der Initiierung einer adaptiven Immunantwort resultiert, agieren dendritische Zellen als wesentliches Bindeglied zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem.

1.2.1 Entdeckung der dendritischen Zelle

Im Jahre 1868 wurde der Zelltyp erstmals vom deutschen Pathologen Paul Langerhans beschrieben. Obwohl ihm auffiel, dass die untersuchten epidermalen Zellen keinen Kontakt zu einander hatten, ordnete er sie in seiner Publikation aufgrund ihrer dendritischen Morphologie den Nervenzellen zu [63]. Die Bezeichnung „Dendritische Zelle“ wurde 1973 von Ralph M. Steinman und Zanvil A. Cohn etabliert [64]. Sie entdeckten die phagozytierenden Zellen in der Milz von Mäusen, erkannten jedoch, dass sie sich deutlich von Makrophagen unterschieden. Für seine herausragenden Erkenntnisse über diesen Zelltyp und dessen Funktion im Immunsystem wurde der kanadische Forscher Ralph M. Steinman 2011 posthum mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin geehrt.

1.2.2 Herkunft

Wie für Leukozyten üblich, entstehen dendritische Zellen (DC) aus den blutbildenden Stammzellen des Knochenmarks. Während der Hämatopoese entwickeln sich die Stammzellen zu myeloiden (common myeloid progenitors - CMP) und lymphoiden Vorläuferzellen (common lymphoid progenitors - CLP). Aus ersteren gehen Monozyten, Makrophagen, Megakaryozyten, Granulozyten und Erythrozyten hervor, aus letzteren T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen. [65, 66]

Lange Zeit ging man davon aus, dass dendritische Zellen ausschließlich myeloiden Ursprungs seien. Es konnte gezeigt werden, dass diese Annahme auf die Mehrheit der DC zutrifft [67]. Diverse Studien belegten jedoch auch die Entwicklung der Immunzellen aus lymphoiden Vorläuferzellen [68].

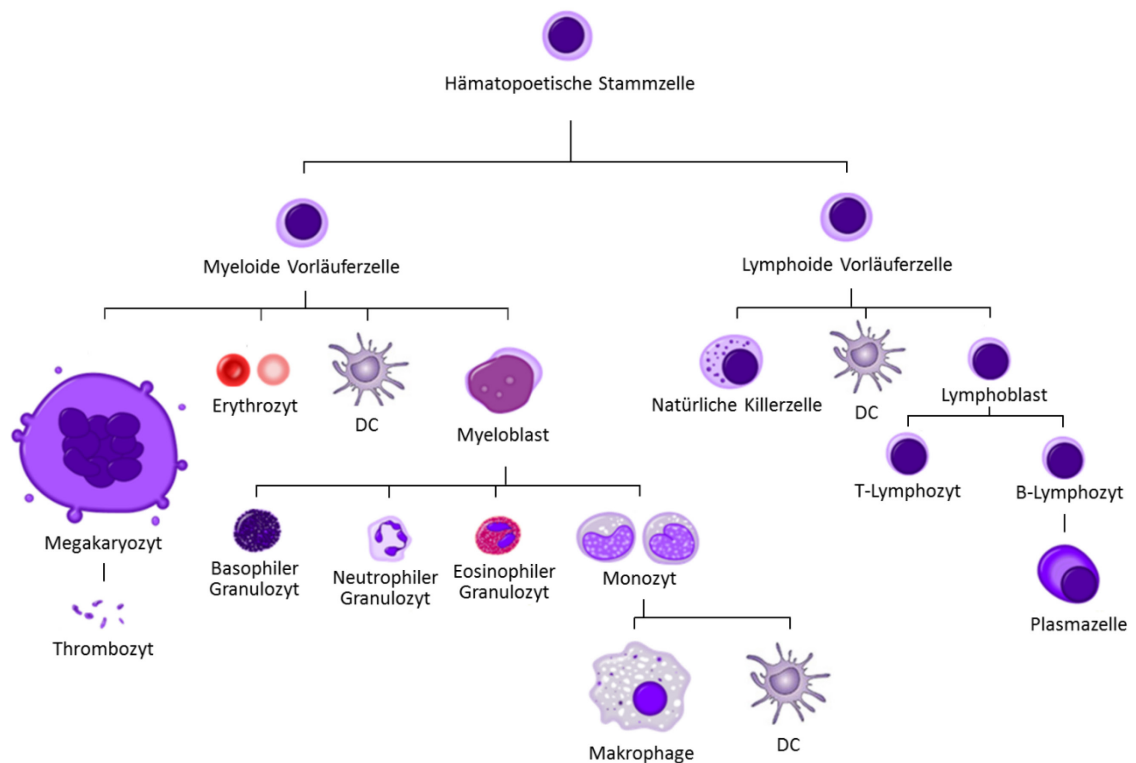


Abb. 1-3: Hämatopoese

modifiziert nach A. Rad, Hematopoiesis (human) diagram [69]

1.2.3 Subpopulationen

Weit verbreitet ist die Gliederung der dendritischen Zellen in konventionelle und unkonventionelle DC.

Konventionelle DC (cDC) entstammen den sogenannten pre-DC und CDP (common DC progenitor) [70]. Sie erfahren eine weitergehende Unterteilung hinsichtlich ihrer Lokalisation. Sie treten im Blutkreislauf, in lymphatischen Geweben wie dem Thymus, der Milz und den Lymphknoten (residente DC) und in nicht lymphatischen Geweben (migratorische DC) auf. Letztere finden sich in großer Zahl in Organen mit Kontakt zur Umwelt, wie zum Beispiel der Haut, der Lunge und dem Gastrointestinaltrakt, aber auch in der Leber und Niere. Charakteristisch ist die auf Antigenkontakt folgende Wanderung der migratorischen DC von den peripheren Geweben über das Lymphsystem zu den Lymphknoten und die dortige Präsentation der Pathogene. Residente DC hingegen sammeln und präsentieren ihre Antigene ausschließlich in den lymphatischen Geweben. Die Internationale Union immunologischer Gesellschaften (IUIS)

charakterisiert die im Blut befindlichen dendritischen Zellen über die Expression von MHCII-Molekülen und das Fehlen von Markern anderer Zellreihen wie CD3 auf T-Lymphozyten, CD14 auf Monozyten und Makrophagen, CD19/20 auf B-Lymphozyten und CD56 auf natürlichen Killerzellen [71]. Darüber hinaus empfiehlt sie die Gliederung zirkulierender Zellen in drei Subtypen: myeloide CD1c⁺/BDCA-1⁺ DC (mDC), myeloide CD141⁺/BDCA-3⁺ DC (mDC) und plasmazytoide CD303⁺/BDCA-2⁺ DC (pDC) [71]. mDC exprimieren im Gegensatz zu pDC typisch myeloide Oberflächenantigene wie CD11c, CD13, CD33 und CD11b [72].

Plasmazytoide, dendritische Zellen (pDC) bilden gemeinsam mit den von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (moDC) die Gruppe der unkonventionellen DC. Obwohl sowohl pDC und als auch konventionelle, dendritische Zellen aus der gemeinsamen Vorläuferzelle CDP hervorgehen [70], unterscheiden sich erstere durch ihr enormes Potenzial zur Produktion von IFN-alpha im Rahmen viraler Infektionen [73]. Interferone forcieren die Rekrutierung aktivierter Makrophagen [74], induzieren die Proliferation von T-Zellen und steigern ihre Lebensdauer [75]. CD303/BDCA-2 ist ein C-Typ-Lektin-Rezeptor, der Erreger für eine spätere T-Zell-Aktivierung internalisiert und bei Antikörperbindung die Interferonproduktion inhibiert [76]. Im Vergleich zu cDC exprimieren pDC eine minimale Zahl costimulatorischer Moleküle und MHC-Moleküle, und zeigen nur eine geringe Kapazität für die Antigenpräsentation [77–79]. Diese kann jedoch kontinuierlich aufrechterhalten werden, da die Synthese der MHC-Moleküle - anders als bei den cDC üblich - auch nach Aktivierung der dendritischen Zelle nicht heruntergefahren wird [80].

Der ursprünglichen Vorstellung zufolge, werden Monozyten im Rahmen inflammatorischer Reaktionen zum entzündlichen Fokus rekrutiert und entwickeln sich dort zu spezialisierten Makrophagen [81]. Dieses Konzept wurde durch in vivo Untersuchungen ergänzt, die die Differenzierung von Ly6C^{hi} Monozyten zu dendritischen Zellen (moDC) demonstrieren konnten [82]. Anfangs ausschließlich während entzündlicher Prozesse beobachtet, konnte die Umwandlung zu moDC bei DC-Subpopulationen der intestinalen und respiratorischen Schleimhaut ebenfalls unter sogenannten „steady state“ Bedingungen nachgewiesen werden [83, 84]. Von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen sind phänotypisch nur schwer von konventionellen dendritischen Zellen zu unterscheiden, da sie mit Oberflächenmarkern wie MHCII, CD11b und CD11c ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen. Ein Indikator ihres monozytären Ursprungs ist das Vorhandensein des Fcγ-Rezeptors 1 (CD 64) [85].

1.2.4 Antigenerkennung und -prozessierung

Dendritische Zellen untersuchen ihre Umgebung mittels sogenannter Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRR) kontinuierlich auf Pathogene bzw. deren molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMP). Die Erkennung eindringender Mikroorganismen durch toll-like Rezeptoren (toll-like receptors, TLR), einer Untergruppe der PRR, initiiert die Reifung der dendritischen Zelle [86]. Diese führt sowohl zu funktionellen und morphologischen als auch phänotypischen Veränderungen. Letztere sind charakterisiert durch die Hochregulation von MHC-Molekülen und costimulatorischen Molekülen (ICAM-1, CD 40, CD 80, CD 83, CD 86), die gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-12, TNF-alpha) und die vermehrte Expression von Chemokin-Rezeptoren (CCR2, CCR5, CCR7) [87]. Im Zuge dieses Reifungsprozesses entwickeln dendritische Zellen ihr Potenzial zur Aktivierung einer T-Zelle. In Abhängigkeit vom Typ des aktivierten Rezeptors exprimieren DC sowohl membrangebundene als auch lösliche Moleküle, die die weitere Differenzierung der T-Zelle (Th1-, Th2-, Th17-, Treg-, Tc1-, Tc2-Zelle) entscheidend beeinflussen [88].

Die Bindung eines Antigens an den toll-like Rezeptor induziert dessen Makropinozytose und sichert auf diesem Weg die effiziente Bildung des MHC-Peptids (MHCp) [89]. Das MHCp ist ein Antigenfragment, welches nach Prozessierung des aufgenommenen Pathogens zur DC-Oberfläche rücktransportiert und dort über MHC-Moleküle präsentiert wird. Die auf diversen DC exprimierten Rezeptoren CD32 und CD64 haben bei Kontakt mit antikörper-opsonierten Zellen und Partikeln ebenfalls die Fähigkeit, deren Phagozytose einzuleiten [90, 91].

1.2.5 Migration

Die Antigenpräsentation erfolgt nach Migration der DC vom Ort des Antigenkontakts in die T-Zell-spezifischen Zonen der sekundären lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten) [92]. Man nimmt an, dass die zielgerichtete Wanderung der dendritischen Zellen vorwiegend durch Chemokine wie CCL19 und CCL21 vermittelt wird. Diese werden von den Endothelzellen des lymphatischen Gewebes sezerniert und locken als Liganden des Chemokin-Rezeptors CCR7 reife dendritische Zellen an [93, 94]. Man vermutet die CCR7-gesteuerten Zellbewegungen sowohl bei migratorischen als auch bei residenten DC [95].

1.2.6 Zellaktivierung

Verglichen mit anderen antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und B-Lymphozyten zeigen dendritische Zellen das größte Potenzial zur Aktivierung von T-Zellen [96]. Da Makrophagen und B-Lymphozyten lediglich Gedächtniszellen reaktivieren, ist die Fähigkeit zur Stimulation von naiven Zellen den dendritischen Zellen vorbehalten. Überdies erbrachten Studien den Nachweis darüber, dass DC in der Lage sind, die Antikörpersynthese in B-Lymphozyten zu initiieren [97].

Man geht davon aus, dass der optimalen Aktivierung naiver T-Helfer-Zellen drei Signale, entsandt durch reife DC, zugrunde liegen [88]. Darüber hinaus lenken die DC die funktionelle Differenzierung zu Th1- oder Th2-Zellen.

Signal 1 entsteht während der Bindung des Peptidfragments, präsentiert von MHCII-Molekülen auf der DC-Oberfläche, an den T-Zell-Rezeptor. Im Zuge dessen wird die antigenspezifische Entwicklung der Immunantwort sichergestellt. Das Signal 2 beruht ebenso wie Signal 1 auf direktem Zell-Zell-Kontakt, kommt dabei jedoch ohne Antigenbeteiligung aus. In erster Linie fungieren hier die membranständigen Costimulationsmoleküle der B7-Familie CD80 und CD86 als Liganden des auf T-Zellen exprimierten Corezeptors CD28. Signal 3 wird durch die Sekretion von Zytokinen vermittelt [98]. Die Natur dieses Zytokinprofils wird maßgeblich durch den Pathogentyp (PAMP) und den aktivierten PRR bestimmt und hat wesentlichen Einfluss auf die bereits erwähnte Polarisierung der Zielzelle [99].

Die optimale Expression des Zytokinprofils erfordert häufig die Feedback-Stimulation durch den CD40-Liganden (CD40L). Er wird nach Aktivierung durch Signal 1 und 2 von T-Zellen exprimiert und kommuniziert mit CD40, einem Rezeptor auf dendritischen Zellen [88]. Ferner werden auf diesem Weg Signalkaskaden ausgelöst, die die Hochregulation von costimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) und MHCII-Molekülen veranlassen [100]. Auf diese Weise wird die Reifung der DC vorangetrieben, die Antigenpräsentation gefördert und schlussendlich die Effektivität der T-Zell-Aktivierung erhöht.

Dendritische Zellen sind in der Lage, sowohl CD4-positive T-Helfer-Zellen als auch CD8-positive zytotoxische T-Zellen zu stimulieren [101]. Studien lassen vermuten, dass letztere unter anderem durch Fc γ -Rezeptor-vermittelte Kreuzpräsentation an MHCI-Molekülen aktiviert werden können [102].

1.2.7 Dendritische Zellen und COPD

Dendritische Zellen agieren als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Ihrer pathogenetischen Beteiligung im Rahmen der COPD wurde eine Reihe von Studien gewidmet.

Die Exposition gegenüber Zigarettenrauch, Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer COPD, hat multiple schädigende Auswirkungen auf das Immunsystem. In einer Studie an dendritischen Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Bestandteile des Zigarettenrauches die Expression von Signalmolekülen supprimieren, welche den DC-Reifeprozess und die T-Zellaktivierung steuern [103]. Bratke et. al fanden auf mDC in der bronchoalveolären Lavage von Rauchern eine erhöhte Zahl der Reifemarker CD80 und CD86 sowie eine verringerte Expression des CCR7-Rezeptors. Die Minderexpression des Chemokin-Rezeptors CCR7 bei Rauchern ist mit einer gesteigerten Atemwegsobstruktion assoziiert [104].

Im Vergleich zu Nierauchern und gesunden Rauchern entdeckten Demedts et al. eine mit dem Schweregrad der Erkrankung steigende Zahl unreifer, dendritischer Zellen in den kleinen Atemwegen von COPD-Patienten. Darüber hinaus verzeichneten sie in Sputum und Lunge einen Anstieg des Chemokins CCL20. Als einzig bekannter Ligand des Chemokin-Rezeptors CCR6, welcher auf isolierten, pulmonalen DC nachgewiesen wurde, könnte der Anstieg eine mögliche Erklärung für das vermehrte Auftreten dendritischer Zellen sein. [105]

Hashimoto et al. vermuteten eine Verbindung zwischen der chronischen Atemwegsentzündung, fibrotischen Umbauvorgängen und dem Auftreten dendritischer Zellen. In einer experimentellen Studie mit Mäusen schützte die Depletion dendritischer Zellen vor IL-1 β -vermittelter T-Zell-Immunantwort und Fibrose. [106]

Insbesondere in den Lungen von Patienten mit schwergradiger COPD konnte ein erhöhtes Vorkommen lymphatischer Follikel festgestellt werden. Man nimmt an, dass sie bedeutsam für die lokale antigenspezifische Immunantwort sind [107]. An der Rekrutierung der Lymphfollikel bildenden B- und T-Zellen sind neben Makrophagen, Endothelzellen und respiratorischen Epithelzellen auch dendritische Zellen beteiligt [108]. In einer Publikation von van Pottelberge et al. wird die Akkumulation plasmazytoider, dendritischer Zellen in den pulmonalen Lymphfollikeln von Patienten mit leichter bis moderater COPD beschrieben [109].

Mori et al. zufolge sind die Grenzflächen zwischen Alveolarlumen und pulmonalen Lymphfollikeln einem fortwährenden Remodeling ausgesetzt und reich an dendritischen Zellen. Diese Areale bilden eine strukturelle Grundlage für die gesteigerte, alveoläre Antigenaufnahme im Rahmen der COPD und tragen auf diese Weise womöglich zur Aggravation der chronischen Entzündungsreaktion bei. [110]

Studienergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe (Stoll et al.) ließen vermuten, dass eine gestörte Costimulation dendritischer Zellen die Krankheitsentstehung der COPD beeinflusst. Das Expressionsverhältnis der beiden costimulatorischen Moleküle OX40L und PD-L1, welches ein Maß für die Imbalance proinflammatorischer und antiinflammatorischer Signale der dendritischen Zellen darstellt, korrelierte mit der Schwere des Lungenemphysems bei COPD-Patienten. [111]

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass der Chemokinrezeptor CCR5, welcher die Aufnahme und Verarbeitung mikrobieller Antigene reguliert, auf mDC von COPD-Patienten deutlich geringer exprimiert war. Die Minderexpression des Chemokinrezeptors CCR5 könnte demzufolge zu einer gestörten Interaktion zwischen dendritischen Zellen und mikrobiellen Antigenen führen. [112]

1.3 Immunglobuline

Zahlreiche chronisch-entzündliche Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis [113], der systemische Lupus erythematodes [114] oder chronisch-entzündliche Darmerkrankungen [115] werden mit Änderungen der Immunglobulinkonzentrationen in Zusammenhang gebracht. Bis dato existieren diesbezüglich kaum Daten für die COPD. Gleiches gilt für die Expression der zugehörigen Immunglobulin-Rezeptoren. Mit der Zerstörung extrazellulärer Mikroorganismen und der Eindämmung intrazellulärer Infektionen übernehmen Immunglobuline als Antikörper eine zentrale Funktion des humoralen Immunsystems [116].

1.3.1 Aufbau und Produktion der Immunglobuline

Das typische Immunglobulin hat ein Molekulargewicht von 150-200 kD und besteht aus vier Polypeptidketten, zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten. Der Aufbau des Moleküls spiegelt sich in zwei strukturell getrennten, eindeutig unterscheidbaren Funktionen wider und wird im Folgenden am Beispiel des Immunglobulins G erläutert. Dessen Form lässt sich anhand des Buchstaben Y nachvollziehen. Die antigenbindende Aktivität wird von den sogenannten Fab-Fragmenten (fragment antigen binding) übernommen, welche sich an den beiden Armen, den aminoterminalen Enden, des Y befinden. Auch als variable Regionen bezeichnet, unterscheiden sie sich entsprechend der Vielfalt der zu registrierenden Pathogene von Antikörper zu Antikörper. Die konstante Region des Immunglobulins liegt an dessen carboxyterminalem Ende, dem Bein der Y-Form. Das dort lokalisierte Fc-Fragment (fragment crystallizable) variiert lediglich unter den fünf Immunglobulin-Isotypen (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD) und bestimmt deren Effektormechanismen. [117]

Immunglobuline agieren sowohl als Serumproteine als auch als Transmembranimmunglobuline an B-Zellen. Nach Antigenbindung initiieren letztere in ihrer Funktion als Rezeptoren die klonale Vermehrung der B-Zellen und deren Differenzierung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen.

1.3.2 Effektormechanismen der Immunglobuline

Es werden drei Wege beschrieben, auf denen Antikörper zur Immunität beitragen. Zum einen neutralisieren sie Pathogene und Toxine, indem sie sie binden und ihre weitere Verbreitung verhindern. Zum anderen erleichtern sie die Phagozytose der Mikroorganismen durch Opsonierung. Hierbei bedecken Antikörper die Oberfläche des Pathogens und aktivieren auf diese Weise die Proteine des Komplementsystems, die nach Bindung an das Antigen, zu dessen Aufnahme in phagozytierende Zellen führen. Über einen direkteren Weg führt die alleinige Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe ebenfalls zur Opsonierung. Fc-Rezeptoren registrieren die Fc-Fragmente der Immunglobuline und haben in Abhängigkeit von der Art der rezeptortragenden Zelle und des korrespondierenden Isotyps unterschiedliche Effekte zur Folge. So kommt es bei Eosinophilen und Mastzellen zur Ausschüttung von Mediatoren und bei Makrophagen zur Aufnahme und Beseitigung des Pathogens.

Dendritische Zellen exprimieren unter anderem den FC_γ -Rezeptor, einen Subtyp der Fc-Rezeptoren. Bisherigen Erkenntnissen zufolge induziert dieser die Endozytose von Antigen-IgG-Komplexen und führt in der Folge zu Zellreifung und MHC-Klasse II vermittelter Antigenpräsentation [118]. Die FC_γ -Rezeptoren I (CD 64) und II (CD32) sind auch Rezeptoren des C-reaktiven Proteins (CRP). Als Hauptrezeptor für das CRP auf Leukozyten gilt der FC_γ -Rezeptor II (CD32). Bharadwaj et al. zufolge sind die Affinitäten des CRP und des Immunglobulin G zu FC_γ -Rezeptor II (CD32) vergleichbar [119].

Studien konnten zeigen, dass das CRP nicht nur als einer der etabliertesten serologischen Marker für das Vorliegen einer systemischen Entzündung anzusehen, sondern selbst bedeutender Regulator inflammatorischer Prozesse ist. So fungiert es als Mediator bei Komplementaktivierung, Apoptose, Phagozytose, NO-Freisetzung und Zytokinausschüttung. Ergebnissen von Kim Y. et al zufolge, konnte die Bindung des CRP an CD32 auf Monozyten zum Stillstand des Zellzyklus mit anschließender Apoptose führen [120]. In Untersuchungen an Endothelzellen stimulierte das CRP via Aktivierung von FC_γ -Rezeptoren die Produktion proinflammatorischer Zytokine und inflammatorischer Mediatoren wie Interleukin-1 β , Tumornekrosefaktor- α und Sauerstoffradikale [121].

Eine Einteilung der Fc_γ-Rezeptoren erfolgt anhand aktivierender und inhibierender Effekte und wird in Tabelle 1-2 dargestellt [122]. Zusammenfassend deuten bisherige Studienergebnisse darauf hin, dass die Balance zwischen aktivierenden und hemmenden Fc_γ-Rezeptoren auf dendritischen Zellen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung dieser antigenpräsentierenden Zellen in Richtung Reifung oder Reifungsstopp haben kann [91].

Tab. 1-2: Einteilung der Fc_γ-Rezeptoren
modifiziert nach [123]

	aktivierender Fc _γ -Rezeptor					inhibierender Fc _γ -Rezeptor
Name	Fc _γ RI [CD64]	Fc _γ RIIA [CD32]	Fc _γ RIIC [CD32]	Fc _γ RIIIA [CD16]	Fc _γ RIIIB [CD16]	Fc _γ RIIB [CD32]
Affinität	hoch	niedrig bis medium	niedrig bis medium	niedrig bis medium	niedrig bis medium	niedrig bis me- dium

Trotz zahlreicher Forschungsbemühungen ist die Immunpathogenese sowie insbesondere die Rolle von Immunglobulinen und ihren Rezeptoren auf myeloiden dendritischen Zellen bei der COPD bisher nur unvollständig verstanden.

1.4 Fragestellungen

- Gibt es Unterschiede zwischen den Serumkonzentrationen von Immunglobulin G bei Nierauchern, Rauchern und COPD-Patienten?
- Gibt es Unterschiede in der Expression der Immunglobulin-Rezeptoren auf myeloiden dendritischen Zellen des Blutes zwischen Nierauchern, Rauchern und COPD-Patienten?
- Ergeben sich aus den abweichenden Immunglobulin-Rezeptorexpressionen veränderte Stimulationsmuster der Reifemarker auf myeloiden dendritischen Zellen?
- Gibt es Unterschiede in der quantitativen Expression der Reifemarker auf myeloiden dendritischen Zellen zwischen Nierauchern, Rauchern und COPD-Patienten?

2 PATIENTEN, MATERIAL, METHODEN

Diese Arbeit fasst die Ergebnisse zweier Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau zusammen. Initial wurde eine größere Anzahl von Probanden in einer klinischen Studie untersucht. Im Anschluss daran wurde bei einer kleineren Anzahl von Probanden in einer separaten Zellkulturstudie ein zusätzlicher experimenteller Versuchsansatz gewählt. Die den Versuchsaufbau betreffenden Unterschiede werden jeweils in expliziten Passagen zur klinischen Studie und zur Zellkulturstudie erläutert.

2.1 Studiendesign

2.1.1 Probanden

In beiden Studien wurden jeweils drei Probandengruppen untersucht. Diese setzten sich aus Patienten mit einer COPD, gesunden Rauchern ohne Lungenfunktionseinschränkung und Nierauchern zusammen. Als Nieraucher galten Probanden, die in ihrem bisherigen Leben zu keinem Zeitpunkt bzw. allenfalls einzelne Male geraucht haben. Folgende Erkrankungen führten zum Ausschluss von der Studie:

- Manifeste, chronische Herzinsuffizienz
- Tumorerkrankungen
- Autoimmunerkrankungen (z.B. Rheumatoide Arthritis, Psoriasis)
- aktive Infektionskrankheiten (z.B. Pneumonie, Tuberkulose)

Für alle Teilnehmer stellte die Gabe von systemischen Kortikoiden in den letzten vier Wochen ein Ausschlusskriterium dar. Probanden der Kontrollgruppen sollten darüber hinaus nicht an chronischen Atemwegs- und Lungenerkrankungen wie zum Beispiel Asthma bronchiale, COPD und Lungenfibrose leiden.

2.1.2 Studienablauf

Nach erfolgter Aufklärung über den Untersuchungsablauf und Vervollständigung eines Fragebogens zur Erfassung von Patientendaten (Name, Geburtstag, Geschlecht, Körpergröße, Gewicht, Body Mass Index (BMI), Untersuchungsdatum), Vorerkrankungen, Medikamentenanamnese und Rauchverhalten bestätigte jeder Teilnehmer seinen Wunsch, an der Studie teilzunehmen, schriftlich.

Alle Probanden unterzogen sich einer Lungenfunktionsdiagnostik und einer Blutentnahme. Diese wurden im Sinne der einheitlichen Versuchsdurchführung zum Ausschluss zirkadianer Effekte allesamt an einem Vormittag zwischen 7.30 und 12.00 Uhr in der Abteilung für Pneumologie des Universitätsklinikums Rostock durchgeführt.

Vor Beginn der Untersuchungen wurde die Studie von der Rostocker Ethikkommission genehmigt. Die Daten der klinischen Studie wurden in der Zeit von April bis Dezember 2013 erhoben. In der Zeit von Juli 2014 bis April 2015 wurden die Probanden im Rahmen der Zellkulturstudie untersucht.

2.2 Lungenfunktionsuntersuchung

Die Lungenfunktionsparameter wurden mithilfe eines Bodyplethysmographen des Typs *Master Screen Body*, JAEGER erhoben. Im Rahmen eines Bronchospasmodolysetests wurden die Probanden im Anschluss an die Gabe eines Beta-2-Sympathomimetikums auf Änderungen der bereits ermittelten spirometrischen Werte untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Messung der pulmonalen Diffusionskapazität.

Methode

Die Ganzkörperplethysmografie liefert sowohl Daten über statische als auch in der Ruhespirometrie bestimmbare, dynamische Lungenvolumina. Zu ersteren gehören zum Beispiel das Residualvolumen und die Totale Lungkapazität. Dieses Routineverfahren ist weitestgehend unabhängig von der Mitarbeit des Untersuchten. Während der Diagnostik sitzt der Patient in einer abgeschlossenen Kabine, umschließt mit dem Mund das sogenannte Mundstück und führt auf Anweisung des Untersuchers diverse Atemmanöver durch. Es werden zum einen

analog zur Ruhespirometrie die Flussänderungen am Pneumotachographen und zum anderen die ventilationsbedingten Änderungen des Kabinendrucks gemessen. Letztere verhalten sich umgekehrt proportional zu den Druckänderungen in den Alveolen, was die Berechnung der statischen Lungenvolumina nach dem Boyle-Mariotte-Gesetz ermöglicht. Es besagt, dass das Produkt aus Volumen und Druck konstant bleibt.

Tab. 2-1: Definitionen der erhobenen Lungenfunktionsparameter

	Definition
Vitalkapazität [VC]	Volumendifferenz zwischen maximaler In- und Expiration
Inspiratorische Vitalkapazität [IVC]	Volumen, das nach vollständiger Expiration maximal eingeatmet werden kann
Forcierte Vitalkapazität [FVC]	Volumen, das nach vollständiger Inspiration unter stärkster Anstrengung schnellstmöglich expiriert werden kann (Tiffeneau-Manöver)
Einsekundenkapazität [FEV1]	Volumen, das nach maximaler Inspiration unter stärkster Anstrengung schnellstmöglich innerhalb der ersten Sekunde expiriert werden kann
Tiffeneau-Index [FEV1/FVC]	Verhältnis von Einsekundenkapazität zu forcierter Vitalkapazität
Mittlere Atemstromstärke [MEF₅₀]	Maximale expiratorische Atemstromstärke bzw. Flussgeschwindigkeit (Flow) zu dem Zeitpunkt, an dem noch 50% der Vitalkapazität auszuatmen sind
Residualvolumen [RV]	Volumen, das nach maximaler Expiration in der Lunge verbleibt
Totale Lungkapazität [TLC]	Volumen, das sich nach maximaler Inspiration in der Lunge befindet
Transferfaktor [TLCO]	CO-Gasmenge, die pro Zeiteinheit und Partialdruckdifferenz zwischen Alveolarluft und kapillärem Blut der Lunge durch die alveolokapilläre Membran hindurch tritt
Transferkoeffizient [TLCO/VA]	Verhältnis der pro Zeiteinheit aufgenommenen CO-Gasmenge zum ventilierten Volumen

Geräte und Materialien

Master Screen Body	[JAEGER, CAREFUSION, HÖCHBERG, D]
Diffusionsmessgerät	[JAEGER, CAREFUSION, HÖCHBERG, D]
Auswertungssoftware	[JAEGER, CAREFUSION, HÖCHBERG, D]
Mundstück	[JAEGER, CAREFUSION, HÖCHBERG, D]

Durchführung

Die Nasenatmung wird durch eine Nasenklemme unterbunden. Der Patient wird nun gebeten, ruhig ein- und auszuatmen. Ist die Atemmittellage erreicht, wird das Atemrohr verschlossen und der Patient aufgefordert, weiterhin ruhig gegen den neu aufgetretenen Widerstand zu atmen. Unterdessen kann das intrathorakale Gasvolumen berechnet werden. Während eines zweiten Atemmanövers der Spirometrie zur Bestimmung dynamischer Lungenvolumina wie der Einsekundenkapazität und Vitalkapazität expiriert der Untersuchte maximal. Daraufhin folgt die maximale Inspiration, um dann im Anschluss mit voller Kraft wieder auszuatmen.

2.3 Gewinnung der Blutproben*Material*

Stauschlauch	[SARSTEDT, NÜMBRECHT, D]
Octeniderm	[SCHÜLKE&MAYR, NORDERSTEDT, D]
Sterile Wattetupfer	[PAUL HARTMANN, HEIDENHEIM, D]
Blutentnahmekanüle [21 G]	[SARSTEDT, NÜMBRECHT, D]
Blutentnahme-Monovetten	[SARSTEDT, NÜMBRECHT, D]
<ul style="list-style-type: none">• EDTA/Lithium-Heparin/Citrat/Serum	
Blutentnahmebeutel	[MACOPHARMA, MOUVAUX, F]

*Durchführung**Klinische Studie*

Nach Punktion der mittleren Ellenbeugenvene wurde den Probanden - wie aus Tabelle 2-2 ersichtlich - Vollblut zur Füllung zweier Monovetten entnommen.

Zellkulturstudie

Jedem Studienteilnehmer wurden unter Punktion einer Vena cubitalis circa 320 ml Vollblut entnommen. Das Volumen verteilte sich wie in folgender Tabelle dargestellt auf fünf Monovetten und einen Blutentnahmebeutel.

Tab. 2-2: Verteilung der entnommenen Blutvolumina

Probengefäß	Anzahl	Verwendungszweck	Volumen
Klinische Studie			
EDTA-Monovette	1	Durchflusszytometrie	7,5 ml
Serum-Monovette	1	Labordiagnostik	2,7 ml
Zellkulturstudie			
EDTA-Monovette	1	Labordiagnostik	2,7 ml
Lithium-Heparin-Monovette	1	Labordiagnostik	2,7 ml
Citrat-Monovette	1	Labordiagnostik	2,7 ml
Serum-Monovette	2	Labordiagnostik (1)	7,5 ml
		Zentrifugation bei 2000g für 10 min, Herstellung von 5 Serumaliquots zu je 300-400 µl, Lagerung bei -20°C (2)	7,5 ml
Blutentnahmebeutel	1	Isolierung der mDC	300 ml

Die in der Zellkulturstudie eingesetzte zweite Serummonovette wurde für den Fall weiterer labordiagnostischer Fragen in Form von Serumaliquots tiefgekühlt.

2.4 Labordiagnostik

Nach der Blutentnahme wurde ein Teil der Proben zur Ermittlung diverser Analyten in das Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin gesendet.

Tab. 2-3: Analyisierte Parameter der klinischen Chemie

* ausschließlich in Zellkulturstudie bestimmt

Zusatz	Analyten
EDTA	Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC Konzentration der Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen/eosinophilen/basophilen Granulozyten
Lithium-Heparin	C-reaktives Protein
Citrat	Fibrinogen
Serum	Immunglobulin G, G ₁ , G ₂ , G ₃ , G ₄ , Immunglobulin M*, Interleukin-6

2.5 Aufreinigung der Leukozyten

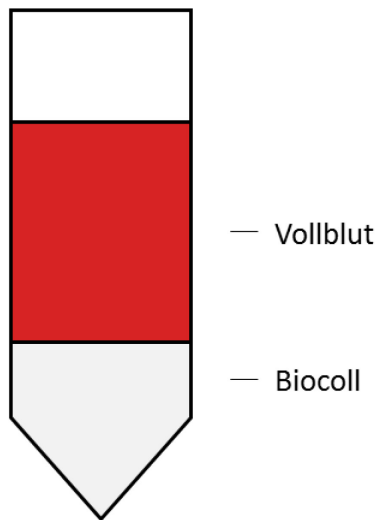
Die Isolation peripherer mononukleärer Zellen sowie die folgenden Arbeitsschritte im Rahmen der Isolation myeloider dendritischer Zellen, der Reinheitskontrolle und der Zellkultivierung fanden ausschließlich in der Zellkulturstudie statt.

2.5.1 Isolation der peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Methode

Die peripheren mononukleären Zellen wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem Vollblut extrahiert. Das verwendete Lösungsmittel *Biocoll* weist eine Dichte von 1,077 g/ml auf. Die zellulären Komponenten des Blutes ordnen sich während der Zentrifugation einem vertikalen Gradienten folgend an. Dabei kommen Bestandteile mit höherer Dichte (Erythrozyten, Granulozyten) unterhalb der *Biocoll*-Lösung zum Stillstand, Bestandteile mit geringerer Dichte oberhalb. Zu letzteren werden die peripheren mononukleären Zellen gezählt, welche in der sogenannten Interphase zu finden sind.

Schichtung vor Zentrifugation



Schichtung nach Zentrifugation

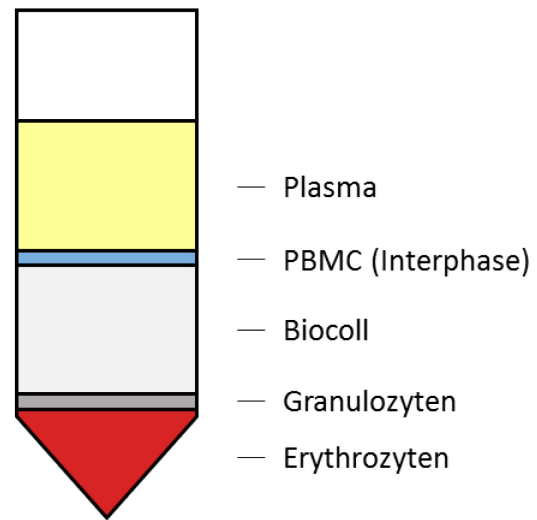


Abb. 2-1: Prinzip der PBMC-Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation

Geräte und Materialien

Zentrifuge Multifuge 1 L-R	[THERMO SCIENTIFIC, KARLSRUHE, D]
Pipettierhilfe Accu-Jet	[BRAND, Wertheim, D]
Pipette Research 100-1000 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Pipettenspitzen Cellstar 25 ml	[GREINER BIOONE, FRICKENHAUSEN, D]
Pipettenspitzen 50-1000 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Falcon-Röhrchen 50 ml	[GREINER BIOONE, FRICKENHAUSEN, D]
Zählkammer Neubauer Improved	[MARIENFELD SUPERIOR, LAUDA-KÖNIGSHOFEN, D]
Eppendorf-Röhrchen 2 ml	[EPPENDORF, HAMBURG, D]

Reagenzien

Biocoll Separating Solution	[BIOCHROM, BERLIN, D]
Dulbecco's PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	[PAA LABORATORIES, PASCHING, A]
Trypanblau	[CARL ROTH GMBH, KARLSRUHE, D]

Durchführung

300 ml Vollblut und 200 ml PBS-Puffer (phosphate-buffered saline / phosphat-gepufferte Salzlösung/Pufferlösung) wurden vorsichtig durchmischt. 35 ml des Blut-PBS-Gemisches wurden langsam in 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert, die jeweils 15 ml Biocoll-Lösung enthielten und anschließend bei 400 g und inaktivierter Bremse für 30 min zentrifugiert. Der Rotor muss ungebremst auslaufen, um die Verwirbelung des Dichtegradienten zu verhindern. Die bei der Zentrifugation entstandene Interphase, ein Zellring aus peripheren mononukleären Zellen direkt oberhalb der Biocoll-Schicht, konnte nun vorsichtig abpipettiert und in neue 50 ml Falcon Röhrchen mit 15 ml PBS-Puffer transferiert werden. Die Zentrifuge wurde im Anschluss auf eine relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 300g und eine Dauer von 10 min bei 4°C eingestellt. Sofern nicht anders angegeben, erfolgten die Waschschrte stets unter diesen Bedingungen. Die in diesem zweiten Durchlauf entstandenen Pellets wurden in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert, in einem Falcon-Röhrchen vereint und zeitgleich mit den im zweiten Durchlauf ebenfalls entstandenen Überständen im Sinne der Restzellgewinnung zentrifugiert. In einem abschließenden Waschschrte konnten die Pellets in ein letztes Röhrchen überführt und zentrifugiert werden. Der Überstand wurde nun vollständig entnommen und das zuletzt gewonnene Pellet in circa 900 µl PBS-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 1 ml gelöst. Um die Anzahl der isolierten peripheren mononukleären Zellen zu bestimmen, wurden 10 µl der Zellsuspension mit einer sterilen Pipette abgenommen und in einer Verdünnungsreihe mit Verhältnissen von 1:10, 1:100 und 1:1000 angefärbt. Hierzu waren jeweils 90 µl Trypanblau in drei Eppendorf-Gefäßen vorgelegt. Die Zellen wurden unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Tote Zellen, die im Vergleich zu vitalen, hell imponierenden Zellen nicht in der Lage waren, den Farbstoff auszuschließen, erschienen tiefblau gefärbt und wurden von der Zählung ausgeschlossen. Folgende Formel führte zum Ergebnis:

$$\text{Zellzahl (Zellen/ml)} = 1 \cdot 10^4 \text{ Zellen/ml} \cdot \text{Zellzahl} / \text{Anzahl der Großquadrate} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.5.2 Isolation der myeloiden dendritischen Zellen

Methode

Um eine Reinheit der myeloiden dendritischen Zellen von über 80% zu erzielen, wurden die mononukleären Zellen unter Verwendung des *Myeloid Dendritic Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec)* mittels magnetischer Zellseparation (MACS) weiter aufgereinigt. Um die Markierung der für die Zellkultur bestimmten Zellen zu umgehen, wurde die Methode der Negativselektion verwendet. Sie dient dem Herausfiltern von nicht benötigten Zellpopulationen. Hierbei binden biotinylierte Antikörper in einem ersten Schritt an die Non-mDC (Monozyten, Lymphozyten, NK-Zellen). Dieser Arbeitsschritt ermöglicht eine Markierung selbiger Zellen mit Anti-Biotin-Antikörpern. An Magnetpartikel, sogenannte Microbeads, gebunden, spielen sie eine zentrale Rolle im gewählten Zellsortierungsverfahren. Da sich die mit Stahlwolle gefüllte Säule im *autoMACS Separator (Miltenyi Biotec)* in einem permanenten, magnetischen Feld befindet, werden derartig gekennzeichnete Zellen in dieser zurückgehalten. Die gewünschten mDC passieren die Säule.

Geräte und Materialien

Zentrifuge Multifuge 1 L-R	[THERMO SCIENTIFIC, KARLSRUHE, D]
Pipette Research 100-1000 µl	[EPPENDORF, Hamburg, D]
Pipettenspitzen 50-1000 µl	[EPPENDORF, Hamburg, D]
Falcon-Röhrchen 15 ml	[GREINER BIOONE, FRICKENHAUSEN, D]
Eppendorf-Röhrchen 2 ml	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Zählkammer Neubauer improved	[MARIENFELD SUPERIOR, LAUDA-KÖNIGSHOFEN, D]
Pre-Separation Filter 30 µm	[MILTENYIBIOTEC, BERGISCHE GLADBACH, D]
Rotationsschüttler Roto-Shake Genie	[SCIENTIFIC INDUSTRIES, NEW YORK, USA]
AutoMACS Separator	[MILTENYIBIOTEC, BERGISCHE GLADBACH, D]
MACS Separation Column	[MILTENYIBIOTEC, BERGISCHE GLADBACH, D]

Reagenzien

Dulbecco's PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}	[PAA LABORATORIES, PASCHING, A]
Myeloid Dendritic Cell Isolation Kit	[MILTENYIBIOTEC, BERGISCH GLADBACH, D]
<ul style="list-style-type: none">• Non-Myeloid Dendritic Cell AB-Biotin Cocktail, human 2 ml• FcR Blocking Reagent, human 2 ml• Anti-Biotin MicroBeads 2 ml	
Zellmedium, X-Vivo 15	[LONZA, VERVIERS, BEL]
autologes Serum [2%]	
Penicillin/Streptomycin	[BIOCHROM, BERLIN, D]
EDTA [0,5 M]	[CARL ROTH GMBH, KARLSRUHE, D]
Albumin Fraktion V	[CARL ROTH GMBH, KARLSRUHE, D]
Trypanblau	[CARL ROTH GMBH, KARLSRUHE, D]

Lösungen

Rinsing Puffer:	500 ml PBS-Puffer + 2 ml EDTA [0,5 M]
Running Puffer:	500 ml PBS-Puffer + 2 ml EDTA [0,5 M] + 2,5 g BSA [10%]
Nährmedium:	10 ml Medium + 200 µl autologes Serum [2%] + 100 µl Penicillin/Streptomycin (5 ml auf 500 ml Medium)

Durchführung

Die einzusetzenden Mengen des Puffers und der Reagenzien richten sich nach der in Kapitel 2.4 bestimmten Zellzahl. Die nachfolgend angegebenen Volumina werden für 10^8 Zellen benötigt. Nach Herstellung des standardmäßig verwendeten „Running Puffers“ und des für die Nutzung des autoMACS Separators zusätzlich erforderlichen Rinsing Puffers wurden die Lösungen steril in die für den Separator vorgesehenen Gefäße filtriert.

Das im Rahmen der Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnene Pellet wurde in einem ersten Waschschrift mit „Running Puffer“ zu einem Gesamtvolumen von 25 ml resuspendiert und bei oben definierter Einstellung zentrifugiert. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes und Lösung der Zellmasse in 300 µl „Running Puffer“ konnte die Zellsuspension mit 100 µl *Non-Myeloid Dendritic Cell Antibody-Biotin Cocktail, human* und 100 µl *FcR Blocking Reagent, hu-*

man versetzt werden. Das Gemisch wurde für 10 min inkubiert und analog zum ersten Waschschrift (unter Zugabe von „Running Puffer“) nochmals zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 400 µl „Running Puffer“ resuspendiert, nach Zugabe von 100 µl *Anti-Biotin MicroBeads* für 15 min inkubiert und einem letzten Waschschrift zugeführt. Die in 500 µl „Running Puffer“ gelöste Zellmasse wurde durch ein Zellsieb (Pre-Separation-Filter) gegeben und konnte nun zur Isolierung der myeloiden dendritischen Zellen im autoMACS Separator genutzt werden. Nachdem die vorbereiteten Pufferlösungen an das Gerät angeschlossen waren, konnte die Zellsortierung unter Verwendung des Programms *Depletion: Depl025* begonnen werden. Die mDC wurden am Ausgang „Neg 1“ aufgefangen und im Anschluss an die Abnahme eines Volumens von 100 µl, welches für die bevorstehende Reinheitskontrolle bestimmt war, ausgezählt. Es folgte eine weitere Zentrifugation, die vollständige Entfernung des Überstandes und die Resuspension der Zellen in einem vorbereiteten Kulturmedium. 10⁶ Zellen wurden in 1 ml Nährmedium kultiviert.

2.6 Reinheitskontrolle mittels Durchflusszytometrie

Methodik

Vor Anlage der Zellkultur wurde die Reinheit der Negativfraktion durchflusszytometrisch geprüft. Über den Nachweis mDC-typischer Oberflächenantigene wie CD11_c und HLA-DR konnte das Vorhandensein der gewünschten Zellpopulation sichergestellt werden. Um Zellen zu unterscheiden, die für eine Verunreinigung der Probe sprechen, wurde diese mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) - markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmerkmale CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56 versetzt. Auf diesem Weg konnten ungewollte Subtypen der PBMC wie Lymphozyten, Monozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten detektiert werden. Eine umfassende Beschreibung hinsichtlich des durchflusszytometrischen Verfahrens folgt in Kapitel 2.7.

Geräte und Materialien

Zentrifuge Multifuge 1 L-R	[THERMO SCIENTIFIC, KARLSRUHE, D]
Pipette Research 20-200 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Pipette Research 0,5-10 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]

Pipettenspitzen 2-200 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Pipettenspitzen 0,5-20 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
FACS-Röhrchen 5 ml	[BECTON DICKINSON, HEIDELBERG, D]
Kleinschüttler MS 3 digital	[IKA, STAUFEN IM BREISGAU, D]

Reagenzien

Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	[PAA LABORATORIES, PASCHING, A]
Fetales Kälberserum [FCS]	[PAA LABORATORIES, PASCHING, A]
Monoklonale Maus - anti human - Antikörper	[BECTON DICKINSON, HEIDELBERG, D]
FITC-markiert: Lin1 (Anti-human Lineage Cocktail 1)	
PE-markiert: CD11 _c	
PerCP-markiert: HLA-DR	
FACS Lysing Solution	[BECTON DICKINSON, HEIDELBERG, D]

Lösungen

FACS Lysing Solution Lösung:	FACS Lysing Solution + destilliertes Wasser [1:10]
FACS-Puffer:	PBS-Puffer + 2% FCS
Natriumazid-Stammlösung [10%]:	Natriumazid-Pulver aufgelöst in PBS-Puffer
Antikörper-Verdünnungslösung:	FACS-Puffer + Natriumazid-Stammlösung
Antikörper-Gebrauchslösung:	Antikörper-Verdünnungslösung + Antikörper-Stammlösung des Herstellers

Durchführung

Nach 20-minütiger Dunkelinkubation des für die Reinheitskontrolle vorgesehenen Aliquots mit jeweils 5 µl des Anti-human Lineage Cocktails 1 (Lin1), der verdünnten PE-markierten Antikörper gegen CD11_c und der verdünnten PerCP-markierten Antikörper gegen HLA-DR wurde der Zellprobe 1 ml vorbereitete FACS Lysing Solution Lösung zugefügt, erneut für 10 Minuten in Dunkelheit inkubiert und bei 400g für 5 Minuten zentrifugiert. Die FACS Lysing Solution hat die Aufgabe, in der Zellprobe verbliebene Erythrozyten zu lysieren. Der entstandene Überstand wurde abgenommen. Nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer, 5-minütiger Zentrifugation

und Resuspension des Pellets in 200 µl PBS-Puffer war die Zellprobe nach Angaben des Herstellers für die FACS-Messung vorbereitet.

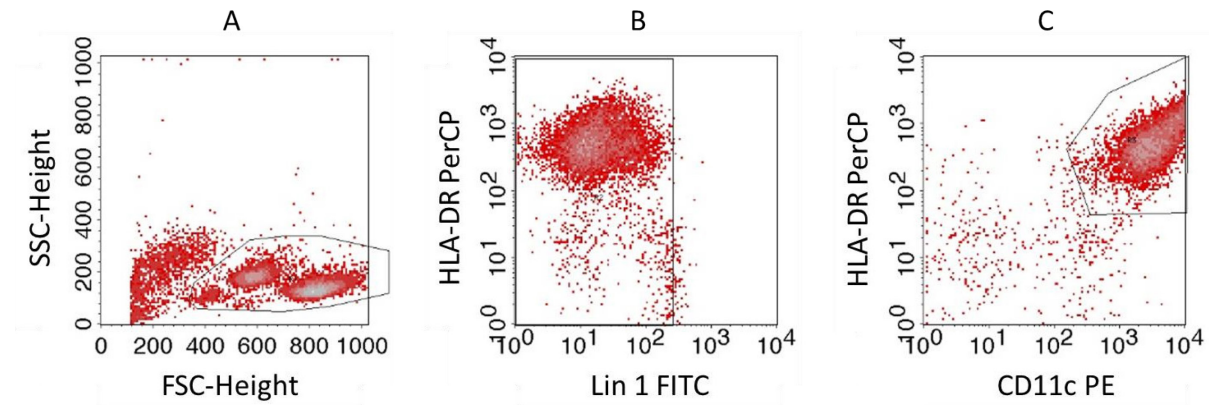


Abb. 2-2: Beispiel einer Reinheitskontrolle nach magnetischer Zellseparation

Die Gesamtheit aller Leukozyten wurde im FSC/SSC - Dot Plot identifiziert. (A) Dendritische Zellen exprimieren die sogenannten Lineage-Marker CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56 nicht bzw. nur schwach. Aus diesem Grund wurden in einem zweiten Schritt alle lineage-negativen Zellen selektiert. (B) Die myeloiden Zellen unter den DC sind durch die Expression von HLA-DR und CD11c gekennzeichnet. (C)

2.7 Zellkultur und Stimulation der myeloiden dendritischen Zellen

Methode

Die isolierten Zellen sollen auf Unterschiede in der Expression von Reifemarkern, beeinflusst durch diverse Stimulationen, untersucht werden. Zu diesem Zweck werden die Zellen mit verschiedenen Antikörpern für 48 Stunden in einem Kulturmedium gehalten.

Geräte und Materialien

Brutschrank Cellstar	[NUNC, Wiesbaden, D]
Sterilbank Herasafe KS 12	[THERMO SCIENTIFIC, KARLSRUHE, D]
96-Well-Zellkulturplatten	[GREINER BIOONE, FRICKENHAUSEN, D]
Pipette Research 20-200 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Pipette Research 0,5-10 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Pipettenspitzen 2-200 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Pipettenspitzen 0,5-20 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]

Reagenzien

Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	[PAA LABORATORIES, PASCHING, A]
Anti- human CD32 - Antikörper, mouse	[BIO RAD LABORATORIES, HERCULES, USA]
Anti- human CD64 - Antikörper, mouse	[BIO RAD LABORATORIES, HERCULES, USA]
Murines IgG1-Antikörper	[BECTON DICKINSON, HEIDELBERG, D]
Flagellin FLA-ST	[INVIVOGEN, SAN DIEGO, D]
Humanes Immunglobulin G	[SIGMA-ALDRICH, ST. LOUIS, USA]

Lösungen

Humanes Immunglobulin G	1:10 Verdünnung der Lösung aus: 1 mg humanem Immunglobulin G + 1 ml PBS-Puffer
-------------------------	--

Durchführung

Die Zelldichte wurde durch Verdünnung auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml Kulturmedium eingestellt. Mit dem Wissen, das in insgesamt 5 Vertiefungen (Wells) der Kulturplatte gleichmäßig Zellsuspension vorgelegt werden musste, wurde mit der Aufteilung der Zellen in 4 ersten Wells begonnen. Im Anschluss konnten 3 dieser Vertiefungen mit Anti-CD32-Antikörpern, Anti-CD64-Antikörpern und murinen Anti-IgG1-Antikörpern in definierter Konzentration versetzt und für 20 Minuten im Brutschrank bei 37°C und einer 5-prozentigen CO₂-Atmosphäre inkubiert werden. Nachdem 4 Wells der Mikrotiterplatte am Vorabend mit einer 10-fach verdünnten Lösung des Humanen Immunglobulins G beimpft wurden, konnte das Zell-Antikörper-Gemisch in die vorbereiteten Wells transferiert werden. Abschließend wurde ein Kontrollansatz ohne Zusatz von Stimulantien und Antikörpern angelegt.

Die Angaben der folgenden Tabelle orientieren sich an einem Zellsuspensionsvolumen von 250 µl je Vertiefung der Kulturplatte. Konnten bei Probanden größere Mengen an myeloiden dendritischen Zellen separiert werden, wurden die Volumina entsprechend angepasst.

Tab. 2-4: Stimulationsschema für die Zellkultur

*unabhängig vom Zellsuspensionsvolumen

Ansatz	Stimulans	Volumen Stimulans	Konzentration Stimulans	Antikörper	Volumen Antikörper	Konzentration Antikörper
1	Humanes IgG	100 µl*	100 µg/ml	Anti-CD32	1,25 µl	5 µg/ml
2	Humanes IgG	100 µl*	100 µg/ml	Anti-CD64	1,25µl	5 µg/ml
3	Humanes IgG	100 µl*	100 µg/ml	Anti-Maus IgG	2,5 µl	5 µg/ml
4	Humanes IgG	100 µl*	100 µg/ml	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-

Zur Kontrolle des Vorhandenseins von Zellen in den Ansätzen wurde jede beimpfte Kavität dahingehend lichtmikroskopisch untersucht.

Ohne Verzögerung erfolgte die Kultivierung der Zellen für 48 Stunden unter oben erwähnten Bedingungen im Brutschrank.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände der Wells aliquotiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Die mDC wurden durch Spülung mit PBS-Puffer aus den Wells gelöst und in fünf Eppendorf-Gefäße überführt. Die Mikrotiterplatte wurde erneut lichtmikroskopisch kontrolliert, um ein Zurückbleiben von kultivierten Zellen in den Kavitäten auf ein Minimum reduzieren zu können.

2.8 Durchflusszytometrie

Methode

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung von Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Quantität, Größe, Granularität und Expression von Oberflächenantigenen auf Einzelzellebene.

Zur Analyse werden die Zellen über eine Glaskapillare eingesogen und einzeln durch den Messbereich eines Laserstrahls geeigneter Wellenlänge geführt. Das entstehende Streulicht wird von Detektoren aufgenommen und dort in elektronische Signale umgewandelt. Auf diesem Weg können Informationen über Granularität und Zellgröße vermittelt werden. Die Auslenkung des Laserstrahls senkrecht zur Bewegungsachse definiert das Seitwärtsstreulicht [SSC = Sideward Scatter], welches durch die „Innere Komplexität“ der Zelle beeinflusst wird. Auf einen zweiten Detektor wird das sogenannte Vorwärtsstreulicht [FSC = Forward Scatter] geleitet. Es breitet sich in derselben Achse wie der Laser aus und ist ein Maß für die Größe der Zelle. Markiert man die Zellen im Voraus unter Zuhilfenahme von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen, wird zusätzlich Fluoreszenzlicht in Form von Photoquanten emittiert. Die Fluorochrome zeichnen sich durch unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren aus. In dieser Studie verwendete Farbstoffe wie Phycoerythrin [PE], Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex [PerCP] und Fluoresceinisothiocyanat [FITC] zeigen im Bereich von 488nm eine gute Absorption und emittieren bei Anregung mit einem Laserstrahl dieser Wellenlänge oranges, rotes und grünes Licht. Allophycocyanin [APC] hingegen wird bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 633 nm auf ein erhöhtes Energieniveau gehoben. Die Konzentration der emittierten Photonen verhält sich proportional zur Menge der zelladhärenten, Fluoreszenz-markierten Antikörper, welche ihrerseits Schlussfolgerungen über die Quantität der Oberflächenmoleküle erlaubt.

Geräte und Materialien

Zentrifuge Multifuge 1 L-R	[THERMO SCIENTIFIC, KARLSRUHE, D]
Durchflusszytometer FACSCalibur	[BECTON DICKINSON, HEIDELBERG, D]
FACS-Software Cellquest Pro	[BECTON DICKINSON, HEIDELBERG, D]
Pipette Research 20-200 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]

Pipette Reasearch 0,5-10 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Pipettenspitzen 2-200 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Pipettenspitzen 0,5-20 µl	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Eppendorf-Röhrchen 2 ml	[EPPENDORF, HAMBURG, D]
Falcon-Röhrchen FACS 5 ml	[BECTON DICKINSON, HEIDELBERG, D]
Kleinschüttler MS 3 digital	[IKA, STAUFEN IM BREISGAU, D]

Reagenzien

Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	[PAA LABORATORIES, PASCHING, A]
Fetales Kälberserum [FCS]	[PAA LABORATORIES, PASCHING, A]
FACS Lysing Solution	[BECTON DICKINSON, HEIDELBERG, D]
Monoklonale Maus - anti human -	[BECTON DICKINSON, HEIDELBERG, D]

Antikörper

PE-markiert:	IgG1, CD80, CD86, CD11c
PerCP-markiert:	IgG1, HLA-DR
APC-markiert:	IgG1, CD83, CD40, CD32, CD64
FITC-markiert:	Lin1

Lösungen

FACS-Puffer:	PBS + 2 % FCS
Antikörper-Gebrauchslösung:	siehe 2.5

Durchführung

Klinische Studie

In die FACS-Röhrchen wurden dem Schema aus Tabelle 2-5 entsprechend 5 µl der jeweiligen Antikörper-Gebrauchslösungen gegeben. Nach Zugabe von 75 µl EDTA-Blut in jedes Röhrchen wurden diese für 20 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde den Zellproben 1 ml vorbereitete FACS Lysing Solution Lösung zugefügt, erneut für 10 Minuten in Dunkelheit inkubiert und bei 420g für 5 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen. Nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer, 5-minütiger Zentrifugation, Dekantierung des

Überstandes und Resuspension des Pellets in 150 µl PBS-Puffer war die Zellprobe für die FACS-Messung vorbereitet. Pro Ansatz wurden 200.000 Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

Tab. 2-5: Ansätze für die FACS-Markierungen

Ansatz-Nr.	FITC	PE	PerCP	APC
1	Lin 1	CD11c	HLA-DR	IgG1
2	Lin 1	CD11c	HLA-DR	CD32
3	Lin 1	CD11c	HLA-DR	CD64

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen beispielhaft die Gating-Strategie zur Detektion der myeloiden dendritischen Zellen und die durchflusszytometrische Analyse der Immunglobulin-Rezeptoren auf mDC.

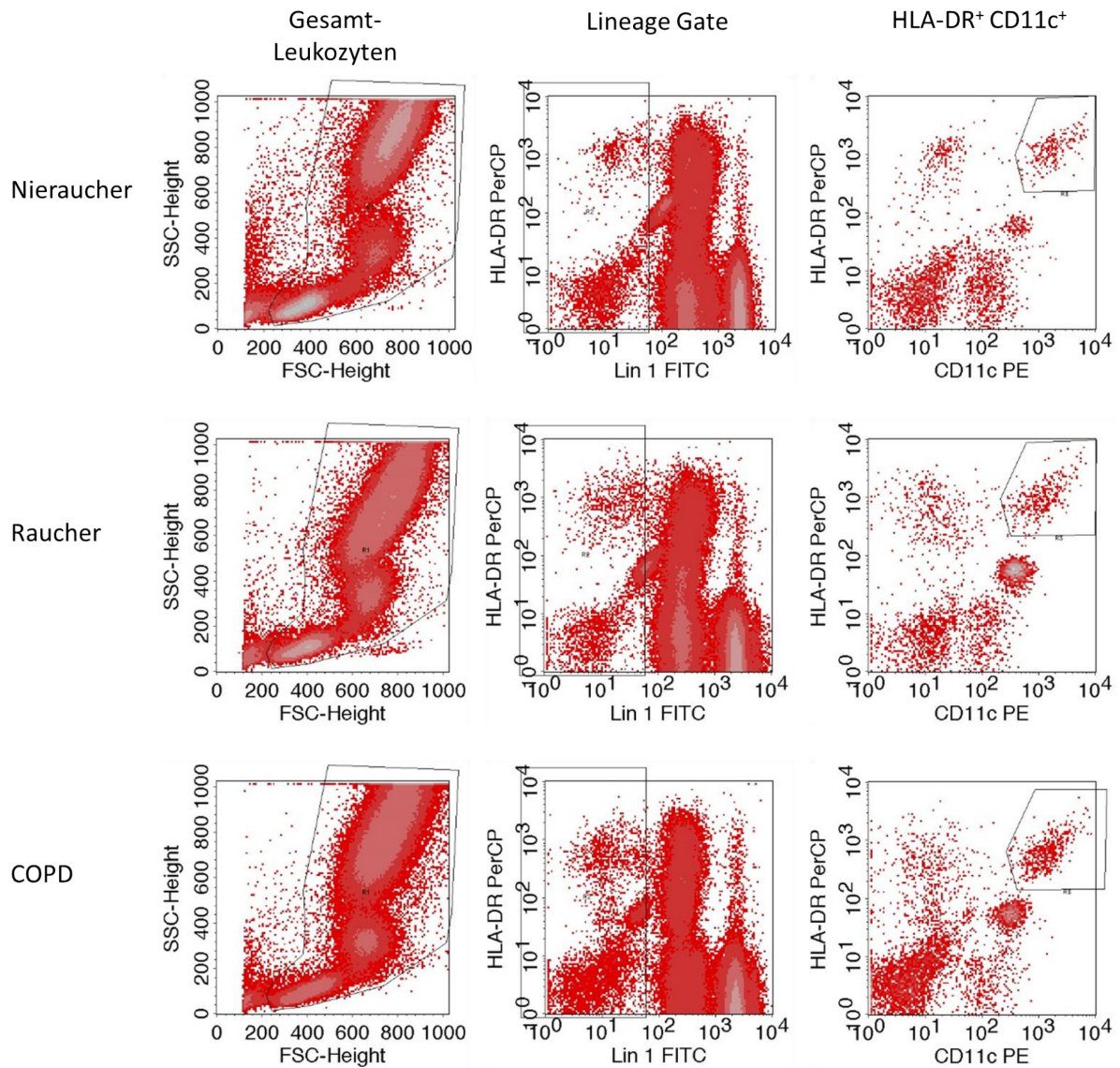


Abb. 2-3: Beispiele für das Gating der mDC im Blut

Die Gesamtheit aller Leukozyten wurde im FSC/SSC- Dot Plot identifiziert (Spalte 1). Dendritische Zellen exprimieren die sogenannten Lineage-Marker CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56 nicht bzw. nur schwach. Aus diesem Grund wurden in einem zweiten Schritt alle lineage-negativen Zellen selektiert (Spalte 2). Die myeloiden Zellen unter den DC sind durch die Expression von HLA-DR und CD11c gekennzeichnet (Spalte 3).

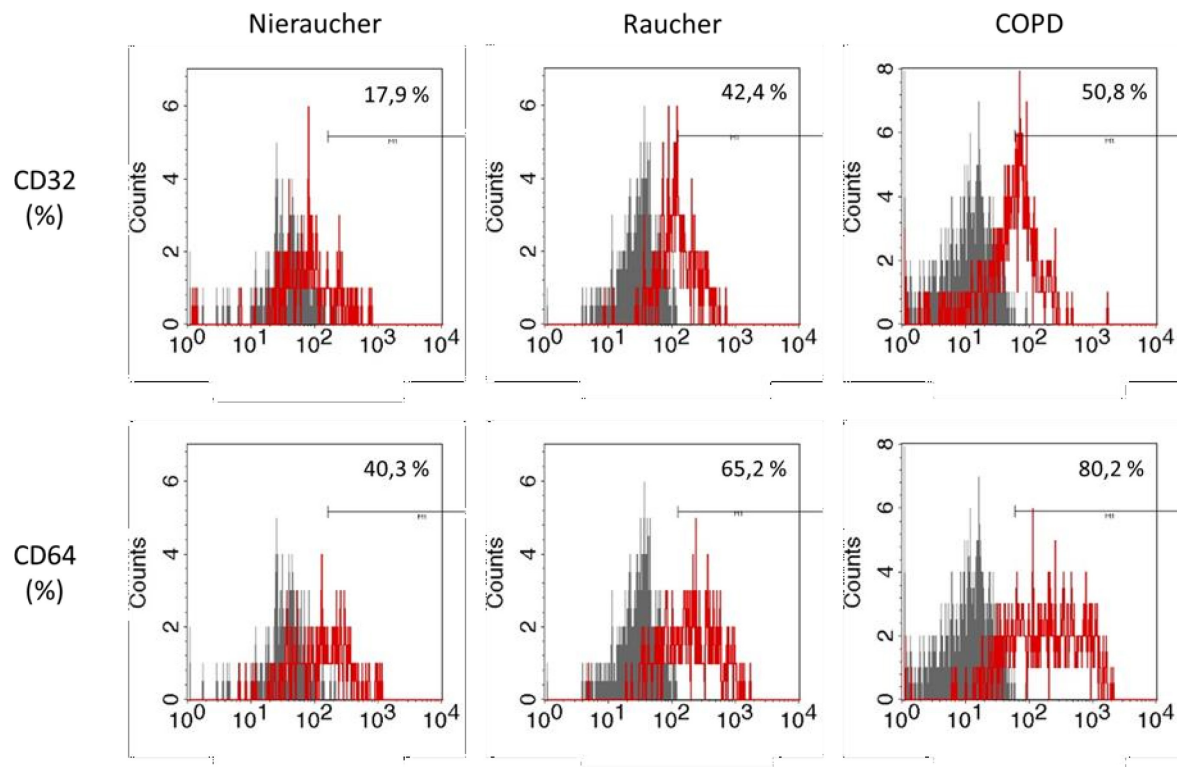


Abb. 2-4: Oberflächenmarker auf dendritischen Zellen

Die Histogramme zeigen den Anteil CD32/CD64 - positiver mDC an der Gesamtheit der mDC. Die Bindungen der Fluorochrom-markierten Antikörper an CD32/CD64 werden rot abgebildet. Unspezifische Bindungen, die durch die Kontroll-Antikörper eingegangen werden, sind grau dargestellt.

Zellkulturstudie

Nach Durchmischung auf dem Vortexschüttler wurde die Zellsuspension aus jedem der fünf Eppendorf-Gefäße jeweils gleichmäßig auf 4 FACS-Röhrchen aufgeteilt. Wie in Tabelle 2-6 aufgeschlüsselt, wurden die 5 * 4 Ansätze mit jeweils 10 µl Antikörper-Gebrauchslösung versetzt, kurz durchmischt und für 20 min in Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zu jedem Ansatz 1000 µl FACS-Puffer pipettiert und die Röhrchen für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Im Anschluss konnten die Überstände verworfen und die entstandenen Pellets in 200 µl PBS-Puffer resuspendiert werden. Pro Ansatz wurden 3.000- 10.000 Zellen analysiert.

Tab. 2-6: Ansätze für die FACS-Markierungen

Ansatz-Nr.	PE	PerCP	APC
1	IgG1	IgG1	IgG1
2	CD 80		CD 40
3	CD 86		CD83
4		HLA-DR	

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR auf kultivierten mDC.

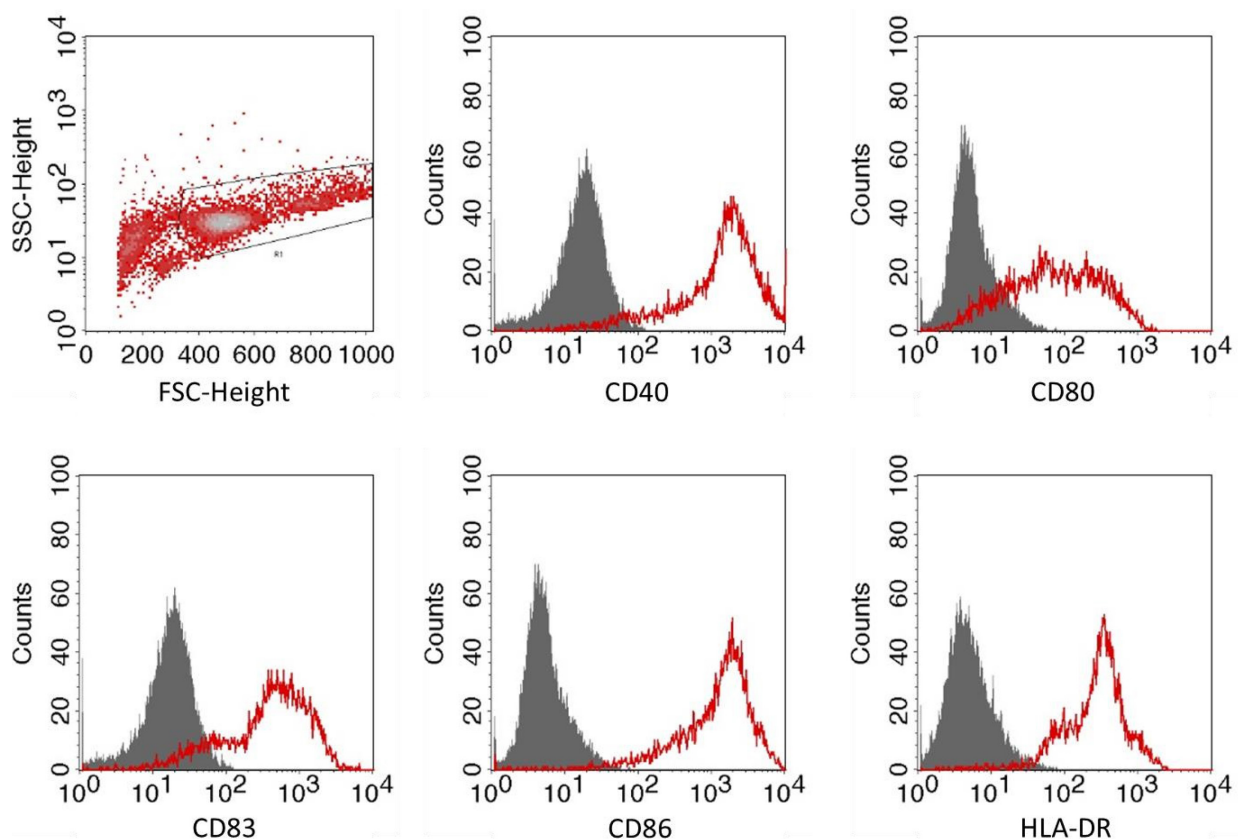


Abb. 2-5: Oberflächenmarker auf kultivierten, dendritischen Zellen

In den Histogrammen wird die Signalstärke der Fluorochrom-markierten Antikörper (z.B. Anti-CD40-Antikörper) gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Während die Signale dieser Antikörper rot dargestellt werden, sind die der Isotypenkontrolle grau.

2.9 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde die Statistik-Software SPSS [IBM, Armonk, New York, USA] herangezogen. Da die Angabe von Mittelwerten normalverteilten Parametern vorbehalten ist, wurde die Verteilung der Werte als Median inklusive Minimum- und Maximumwerten dargestellt. Der Vergleich zweier Kohorten erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Proben. Beim Vergleich von Daten innerhalb einer Kohorte (z.B. Expression von CD86 in verschiedenen Stimulationsansätzen) wurde der Wilcoxon-Test angewendet. Die Korrelationsanalysen erfolgten mittels des Spearman's Rang-Korrelationskoeffizienten. Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Anhand der folgenden Abbildung soll die grafische Darstellung mittels Box Plots veranschaulicht werden.

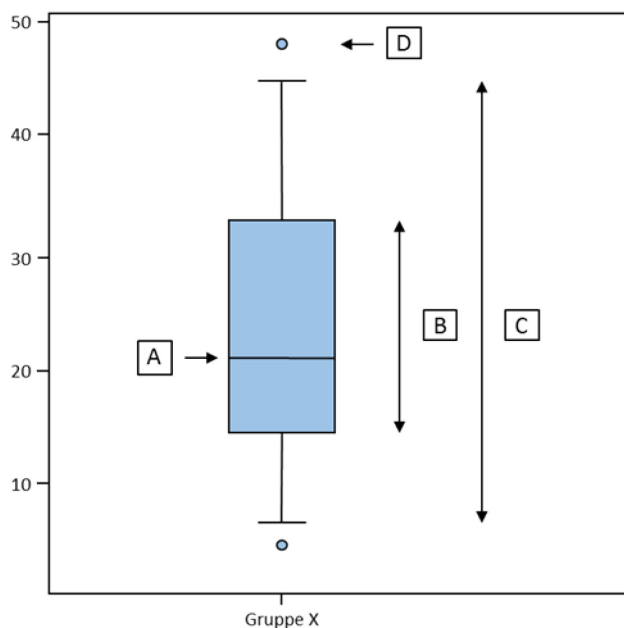


Abb. 2-6: Beispiel für ein Boxplot-Diagramm

A – Median

B – Interquartilenabstand (IQA)

C – Bereich der Werte, die $< 1,5$ IQA vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind

D – Extremwerte = Werte, die $> 1,5$ IQA vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind

In diesem Diagrammtyp verkörpert die Box den Interquartilenabstand. Die innerhalb der Box gelegene, vertikale Linie repräsentiert den Median. Zwei außerhalb gelegene Linien markieren

den Bereich der Werte, der weniger als 150 % des Interquartilenabstands vom oberen und unteren Rand der Box entfernt liegt. Als Punkt angegebene Ausreißer stellen Werte dar, deren Abstand vom Rand der Box 150 % des Interquartilenabstands überschreitet.

3 ERGEBNISSE

Die folgenden Tabellen fassen die in den Patienten- und Kontrollgruppen erhobenen Daten mittels Angabe der errechneten Medianwerte zusammen und zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Kohorten auf. Zugehörige Minimum- und Maximumwerte wurden in eckigen Klammern dargestellt.

3.1 Klinische Studie

3.1.1 Charakterisierung der Studienpopulation

An der klinischen Studie beteiligten sich insgesamt 21 Nieraucher, 21 Raucher und 54 COPD-Patienten, deren Alters- und Geschlechterverteilung vergleichbar waren. Die Rauchergruppe war im Vergleich zu den zwei weiteren Gruppen durch eine signifikante Erhöhung des medianen BMI gekennzeichnet. Die Anzahl der Packungsjahre (pack years) unterschied sich zwischen den Gruppen der Raucher und COPD-Patienten nicht signifikant.

Tab. 3-1: Anamnestische und anthropometrische Charakteristika der klinischen Studie

	Nieraucher (N)	Raucher (R)	COPD (C)	N vs. R	N vs. C	R vs. C
	n=21	n=21	n=54	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Alter (Jahre)	63 [50-79]	61 [51-75]	59 [40-85]	0,337	0,274	0,859
Geschlecht (m/w)	12/9	13/8	35/19	0,753	0,753	0,949
BMI (kg/m ²)	25,5 [20,7-32,2]	29,4 [18,3-38,8]	25,0 [15,0-41,0]	0,036	0,683	0,038
Pack years (PY)	0 [0-0]	39 [23-69]	38 [5-80]	<0,001	<0,001	0,262
GOLD (Stadium)	0 [0-0]	0 [0-0]	3 [2-4]	n.a.	n.a.	n.a.

3.1.2 Klinische Chemie und Lungenfunktionsdiagnostik

In der klinischen Chemie fiel die COPD-spezifische Erhöhung der Interleukin-6-Konzentration im Vergleich zu Nierauchern und Rauchern auf. Die CRP-Konzentration war bei Rauchern und COPD-Patienten erhöht.

Die Klassifizierung der spirometrischen Schweregrade orientierte sich an den Empfehlungen der GOLD (Tabelle 1-1). Demzufolge wurden 14 COPD-Patienten dem Stadium II, 26 Patienten dem Stadium III und 14 Patienten dem Stadium IV nach GOLD zugeordnet. Sowohl die Einsekundenkapazität als auch der Tiffeneau-Index waren im Vergleich von COPD-Erkrankten mit Nierauchern und Rauchern hochsignifikant erniedrigt. In der Patientengruppe ergab sich für die FEV1 ein Medianwert von 38 % vom Soll. Der Tiffeneau-Index belief sich hier auf 49 %.

Tab. 3-2: Laborchemische und spirometrische Parameter der klinischen Studie

	Nieraucher (N)	Raucher (R)	COPD (C)	N vs. R	N vs. C	R vs. C
	n=21	n=21	n=54	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Labordiagnostik						
Fibrinogen (g/l)	3,0 [2,4-4,8]	3,6 [2,5-5,4]	4,2 [2,2-6,4]	0,020	<0,001	0,153
CRP (mg/l)	1,0 [1,0-8,2]	3,7 [1,0-14,8]	3,5 [1,0-24,3]	<0,001	<0,001	0,552
IL-6 (pg/ml)	2,2 [1,5-5,6]	2,4 [1,5-6,9]	4,2 [1,5-14,4]	0,362	<0,001	0,004
Lungenfunktion						
FEV1 (l)	3,24 [1,88-5,10]	2,86 [1,83-3,91]	1,04 [0,51-2,44]	0,113	<0,001	<0,001
FEV1 (%SOLL)	112 [84-133]	98 [66-124]	38 [16-75]	0,005	<0,001	<0,001
IVC (l)	3,69 [2,21-6,51]	3,50 [2,06-5,39]	2,72 [0,99-4,89]	0,320	<0,001	0,003
IVC (%SOLL)	106 [61-128]	95 [57-132]	79 [25-114]	0,090	<0,001	0,007
FEV1/FVC (%)	81 [73-86]	80 [71-94]	49 [28-69]	0,521	<0,001	<0,001

3.1.3 Immunglobulindiagnostik

In der Immunglobulindiagnostik zeigten sich die IgG- und IgG1-Konzentrationen der Raucher und COPD-Patienten im Vergleich zu denen der Nieraucher erniedrigt. Es fand sich jedoch kein Unterschied zwischen Rauchern und Patienten mit COPD.

Tab. 3-3: Immunglobulinkonzentrationen im Serum

	Nieraucher (N)	Raucher (R)	COPD (C)	N vs. R	N vs. C	R vs. C
	n=21	n=21	n=54	p-Wert	p-Wert	p-Wert
IgG (g/l)	11,7 [7,9-14,0]	9,2 [5,6-16,4]	8,7 [5,3-20,0]	0,028	<0,001	0,270
IgG₁ (g/l)	6,7 [4,1-8,8]	4,7 [3,4-9,2]	5,1 [3,0-13,4]	0,042	0,003	0,976
IgG₂ (g/l)	3,9 [1,3-7,3]	3,0 [0,67-9,14]	3,0 [0,8-6,6]	0,159	<0,001	0,181
IgG₃ (g/l)	0,6 [0,2-2,0]	0,7 [0,1-1,4]	0,66 [0,1-2,4]	0,557	0,772	0,784
IgG₄ (g/l)	0,4 [0,1-1,9]	0,4 [0,0-1,8]	0,3 [0,0-1,9]	0,735	0,129	0,336

3.1.4 Vergleich der Expression von CD32 und CD64 auf mDC zwischen den Gruppen

In der klinischen Studie zeigten sich zwischen allen drei Probandengruppen signifikante Unterschiede in der Expression des Immunglobulin-Rezeptors CD32 (Fc γ -Rezeptor II) auf mDC. Gleiches gilt für CD64 (Fc γ -Rezeptor I) mit der Einschränkung, dass sich im Vergleich der Raucher- und Patientengruppe keine relevante Abweichung ergab. Somit fand sich eine COPD-spezifische Erhöhung der CD32 - Expression auf mDC im Blut.

Tab. 3-4: Oberflächenmarker auf myeloiden dendritischen Zellen

	Nieraucher (N)	Raucher (R)	COPD (C)	N vs. R	N vs. C	R vs. C
	n=21	n=21	n=54	p-Wert	p-Wert	p-Wert
CD 32 (% positive mDC)	18 [1-55]	39 [8-84]	52 [8-92]	0,016	<0,001	0,029
CD 64 (% positive mDC)	61 [29-85]	75 [54-85]	73 [41-95]	0,005	0,002	0,595

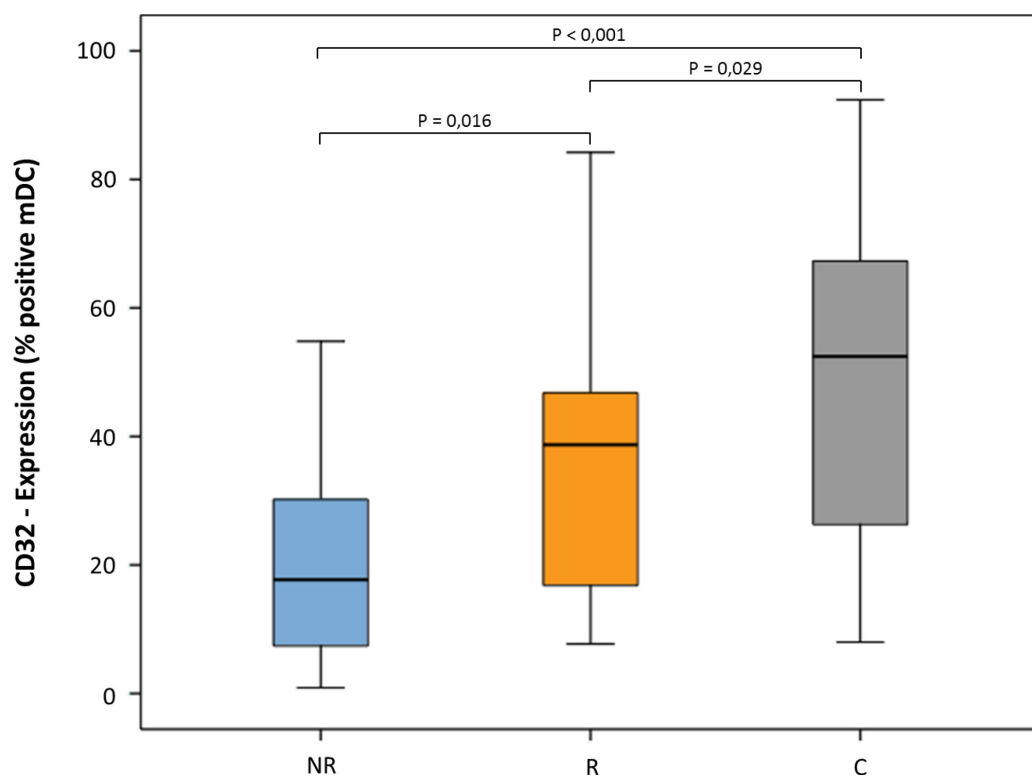


Abb. 3-1: Verteilung des Oberflächenmarkers CD32 in den untersuchten Gruppen
NR (Nieraucher), R (Raucher), C (COPD-Patienten)

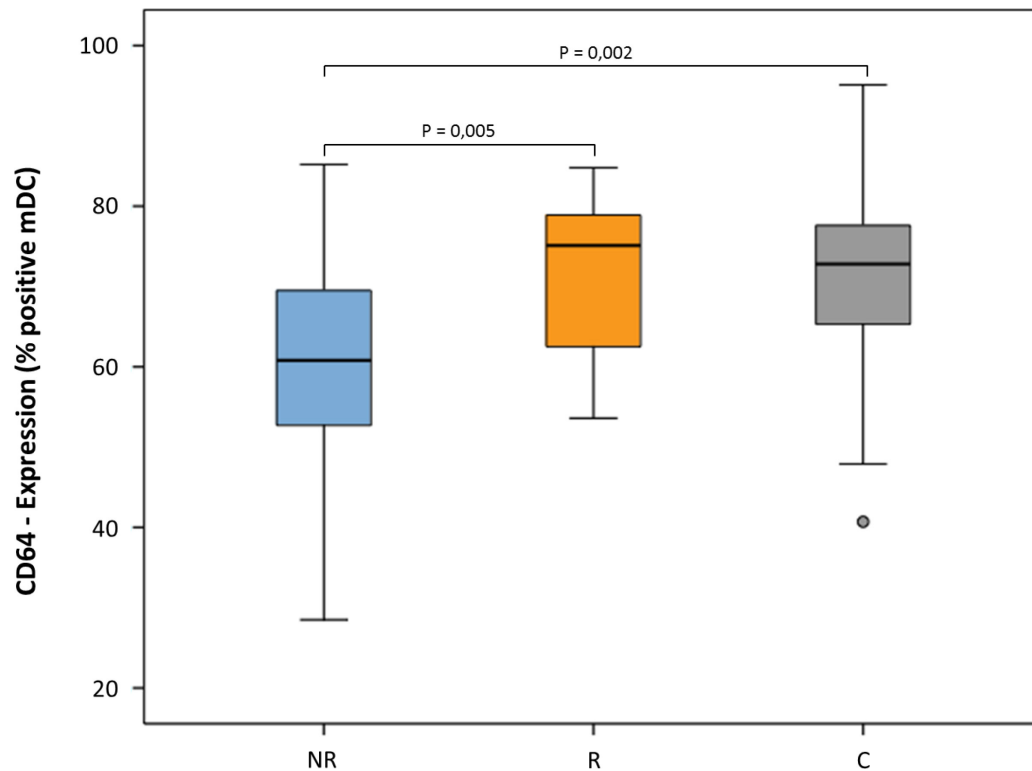


Abb. 3-2: Verteilung des Oberflächenmarkers CD64 in den untersuchten Gruppen
 NR (Nieraucher), R (Raucher), C (COPD-Patienten)

3.1.5 Korrelationsanalysen

In der Korrelationsanalyse von Immunglobulinen und ihren Rezeptoren ergab sich für die Konzentration von IgG₂ und die Expression von CD32 auf myeloiden DCs eine negative Korrelation ($r = -0,312$; $p = 0,022$) bei COPD-Patienten (Abb. 3-13). Eine ähnliche negative Korrelation ergab sich zwischen der IgG₃-Konzentration im Serum und der CD32-Expression auf mDC ($r = -0,276$, $p = 0,044$) (Abb. 3-14). Darüber hinaus zeigte sich bei COPD-Patienten auch zwischen Gesamt-IgG und CD32 eine Tendenz zur negativen Korrelation ($r = -0,241$, $p = 0,079$). Bei Rauchern und Nierauchern hingegen war eine solche Korrelation zwischen Immunglobulin G und den Immunglobulin-Rezeptoren nicht festzustellen.

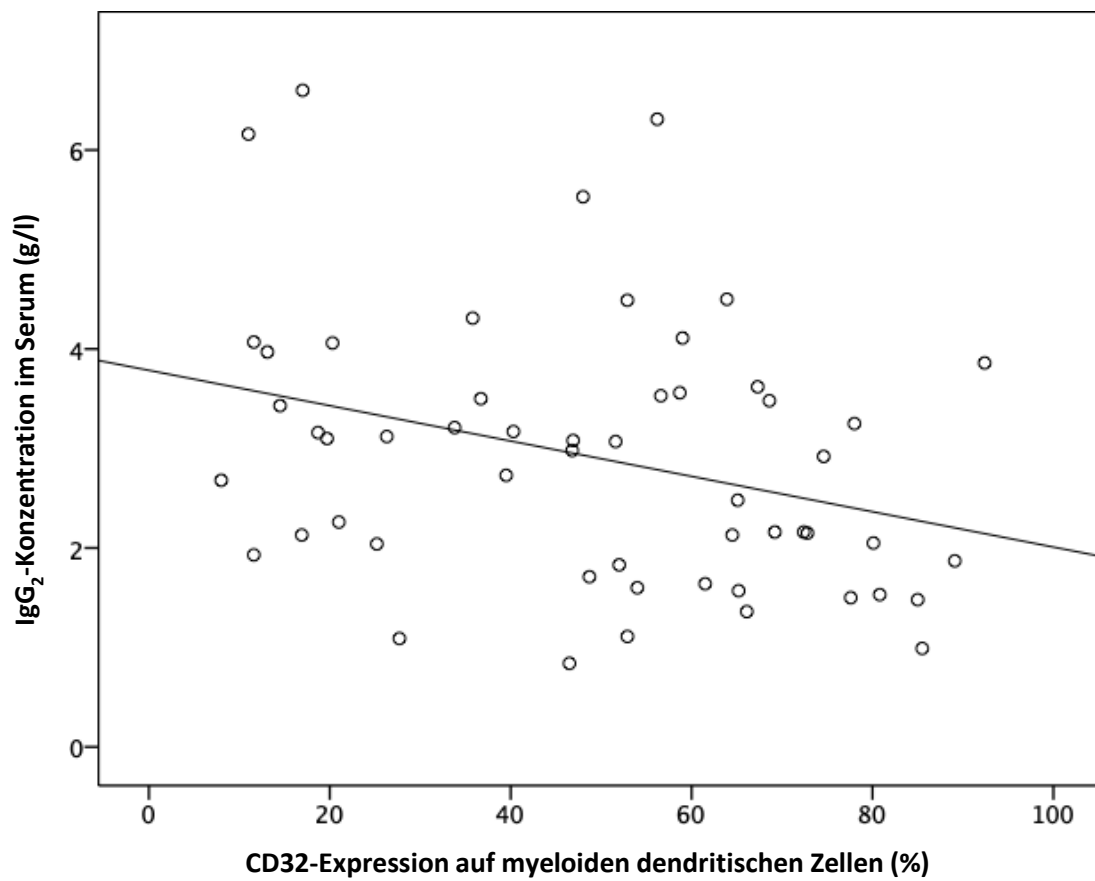


Abb. 3-3: Korrelation der Serum-IgG₂-Konzentration mit der Expression von CD32 auf myeloiden dendritischen Zellen bei Patienten mit COPD

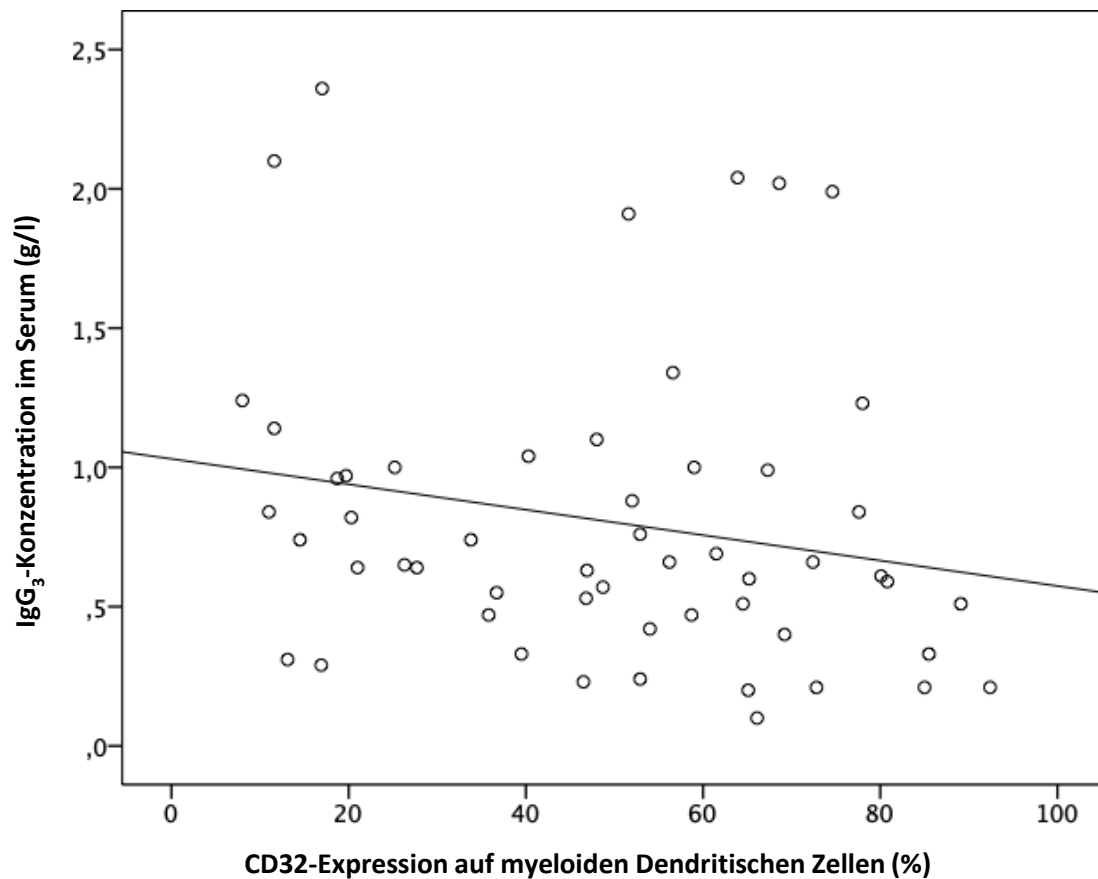


Abb. 3-4: Korrelation der Serum-IgG₃-Konzentration mit der Expression von CD32 auf myeloiden dendritischen Zellen bei Patienten mit COPD

3.2 Zellkulturstudie

3.2.1 Charakterisierung der Studienpopulation

An der Zellkulturstudie nahmen insgesamt 22 Probanden im Alter von 36 bis 70 Jahren teil. Die Gruppen der Nieraucher, Raucher und COPD-Patienten sind in ihrer Alters- und Geschlechterverteilung als vergleichbar bzw. nahezu identisch anzusehen. Lediglich der Altersunterschied zwischen ersteren und letzteren weist bei mittleren Werten von 51 und 59 Jahren eine Signifikanz von $p = 0,021$ auf. Bei der Betrachtung des BMI ergaben sich keine wesentlichen Abweichungen. Der Medianwert der Raucher von 27 Packungsjahren erreichte keine statistische Signifikanz gegenüber dem der COPD-Patienten (34 Packungsjahre). Unter diesen belief sich der aktuelle Raucheranteil auf 37,5%. Angaben zur inhalativen und oralen Dauermedikation sind in Tabelle 3-5 zu finden.

Tab. 3-5: Anamnestische und anthropometrische Charakteristika der Zellkulturstudie

LABA (langwirksames Beta-2-Sympathomimetikum), **LAMA** (langwirksamer Muskarinantagonist), **ICS** (inhalatives Kortikosteroid), **OCS** (orales Kortikosteroid), **n** (Anzahl der Behandelten)

	Nieraucher (N)	Raucher (R)	COPD (C)	N vs. R	N vs. C	R vs. C
	n=7	n=7	n=8	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Alter (Jahre)	51 [42-56]	53 [38-65]	59 [44-71]	0,902	0,021	0,072
Geschlecht (m/w)	3/4	4/3	4/4	n.a.	n.a.	n.a.
BMI (kg/m ²)	26,0 [20,7-30,0]	25,5 [21,1-27,8]	28 [21-43]	0,710	0,336	0,463
Aktueller Rau- cheranteil	0/7	7/7	3/8	n.a.	n.a.	n.a.
Pack years (PY)	0 [0-0]	27 [5-96]	34 [12-72]	n.a.	n.a.	0,779
GOLD (Stadium)	0 [0-0]	0 [0-0]	2 [2-3]	n.a.	n.a.	n.a.
LABA/LAMA (n)	0/0	0/0	7/6	n.a.	n.a.	n.a.
ICS/OCS (n)	0/0	0/0	3/0	n.a.	n.a.	n.a.

3.2.2 Klinische Chemie und Lungenfunktionsdiagnostik

Obwohl sich der mittlere CRP-Wert der Patientengruppe im Vergleich zu dem der Raucher- und Nierauchergruppe um 2,4 mg/l größer zeigte, war der Unterschied in beiden Fällen nicht statistisch signifikant. Die Serumkonzentration des Fibrinogen dagegen war in der Gruppe der COPD-Patienten jeweils signifikant höher als bei Nierauchern oder Rauchern. Die Konzentration des Interleukin-6 war bei den Nierauchern signifikant niedriger als bei den COPD-Erkrankten, Unterschiede zwischen Rauchern und Nierauchern bzw. COPD-Patienten ergaben sich nicht.

Die Klassifizierung der spirometrischen Schweregrade orientierte sich an den Empfehlungen der Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (Tabelle 1-1). Demnach wurde der Großteil der Patienten der Schweregradklasse II zugeordnet. Die relativen FEV1-Werte der COPD-Patienten, Raucher und Nieraucher lagen im Median bei 56 %, 95 % und 103 %. Die Einsekundenkapazität, deren Verhältnis zur funktionellen Vitalkapazität (Tiffeneau-Index) und die mittlere Atemstromstärke in der Patientengruppe erwiesen sich im Vergleich zu selbigen

Parametern in den Kontrollgruppen als signifikant erniedrigt, das Residualvolumen hingegen war erhöht. Bei der Gegenüberstellung der funktionellen Vitalkapazitäten und Diffusionskapazitäten konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden.

Tab. 3-6: Laborchemische und spirometrische Parameter der Zellkulturstudie

	Nieraucher (N) n=7	Raucher (R) n=7	COPD (C) n=8	N vs. R p-Wert	N vs. C p-Wert	R vs. C p-Wert
Labordiagnostik						
Fibrinogen (g/l)	2,7 [2,2-3,4]	2,8 [2,1-4,9]	3,4 [3,0-4,7]	0,620	0,023	0,029
CRP (mg/l)	0,0 [0,0-25,1]	0,0 [0,0-7,1]	2,4 [0,0-12,4]	0,902	0,397	0,463
IL-6 (pg/ml)	1,7 [0,0-1,8]	2,2 [0,0-5,5]	3,3 [0,0-3,6]	0,366	0,022	0,128
Lungenfunktion						
IVC (l)	3,62 [2,54-5,37]	3,04 [2,62-7,30]	3,28 [2,67-3,69]	0,805	0,232	0,613
IVC (%SOLL)	109 [94-115]	95 [64-115]	88 [79-105]	0,128	0,004	0,336
FEV1 (l)	2,84 [2,22-4,28]	3,09 [2,36-5,30]	1,61 [1,11-2,02]	1,000	<0,001	<0,001
FEV1 (%SOLL)	103 [95-122]	95 [87-113]	56 [35-76]	0,073	<0,001	<0,001
FVC (l)	3,65 [2,51-5,24]	3,54 [2,64-7,19]	2,88 [2,15-3,38]	1,000	0,054	0,094
FVC (%SOLL)	110 [95-118]	98 [78-118]	76 [66-103]	0,259	0,002	0,021
FEV1/FVC (%)	82 [78-88]	81 [72-89]	53 [35-68]	1,000	<0,001	<0,001
MEF₅₀ (l/s)	3,43 [3,35-5,57]	3,83 [3,39-5,57]	0,78 [0,36-1,36]	0,535	<0,001	<0,001
MEF₅₀ (%SOLL)	91 [66-120]	90 [60-120]	18 [8-36]	0,805	<0,001	<0,001
RV (l)	1,84 [1,33-3,46]	2,27 [1,52-3,65]	3,33 [2,23-6,55]	0,383	0,004	0,029
RV (%SOLL)	93 [83-157]	96 [71-206]	170 [121-281]	0,710	0,001	0,029
TLC (l)	5,31 [3,98-8,84]	6,67 [4,26-9,01]	6,72 [5,21-10,18]	0,805	0,397	0,779
TLC (%SOLL)	104 [94-117]	97 [81-132]	120 [95-146]	0,383	0,054	0,054
TLCO (l)	1,52 [1,39-1,69]	1,42 [0,99-1,89]	1,19 [0,64-1,81]	0,530	0,053	0,432
TLCO (%SOLL)	96 [83-107]	91 [61-132]	82 [47-103]	0,755	0,097	0,530

3.2.3 Zellstimulation

Dargestellt sind im Folgenden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) bzw. die Expression der fünf Oberflächenmarker CD80, CD40, CD86, CD83 und HLA-DR, die durchflusszytometrisch für die kultivierten Zellen bestimmt worden sind. Signifikante Unterschiede bei Vergleich der Stimulationsansätze mit den entsprechenden Kontrollansätzen wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen den Probandengruppen wurden durch eine Verbindungslinie kenntlich gemacht. Eine horizontale Strichlinie markiert die Expression des Oberflächenmarkers im jeweiligen Kontrollansatz.

CD 80

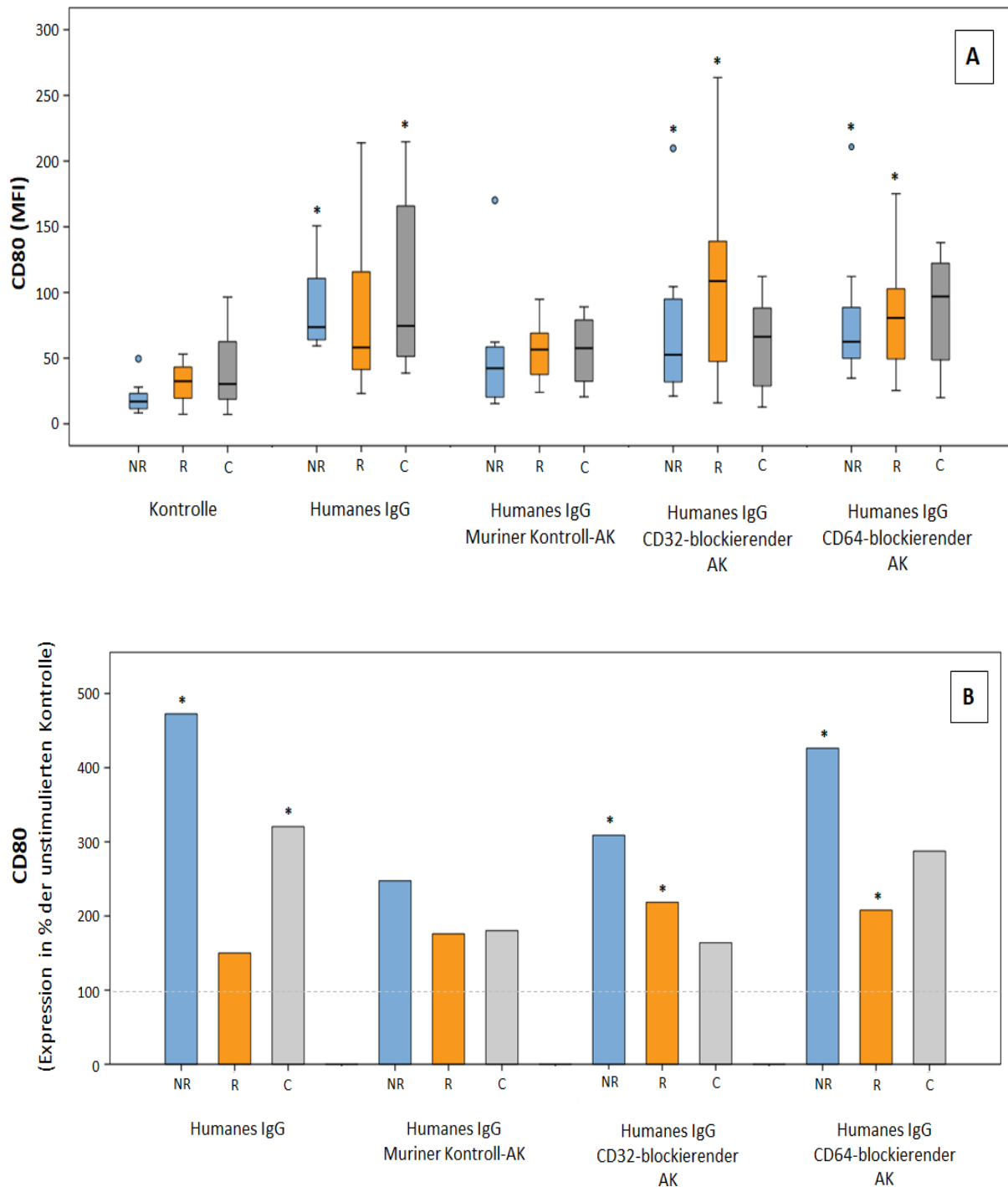


Abb. 3-5: CD 80 - Expression der mDC in der Zellkultur

A als Absolutwert

B im Vergleich zum Kontrollansatz (% Kontrolle)

MFI (mittlere Fluoreszenzintensität), **NR** (Nieraucher), **R** (Raucher), **C** (COPD-Patienten)

CD 40

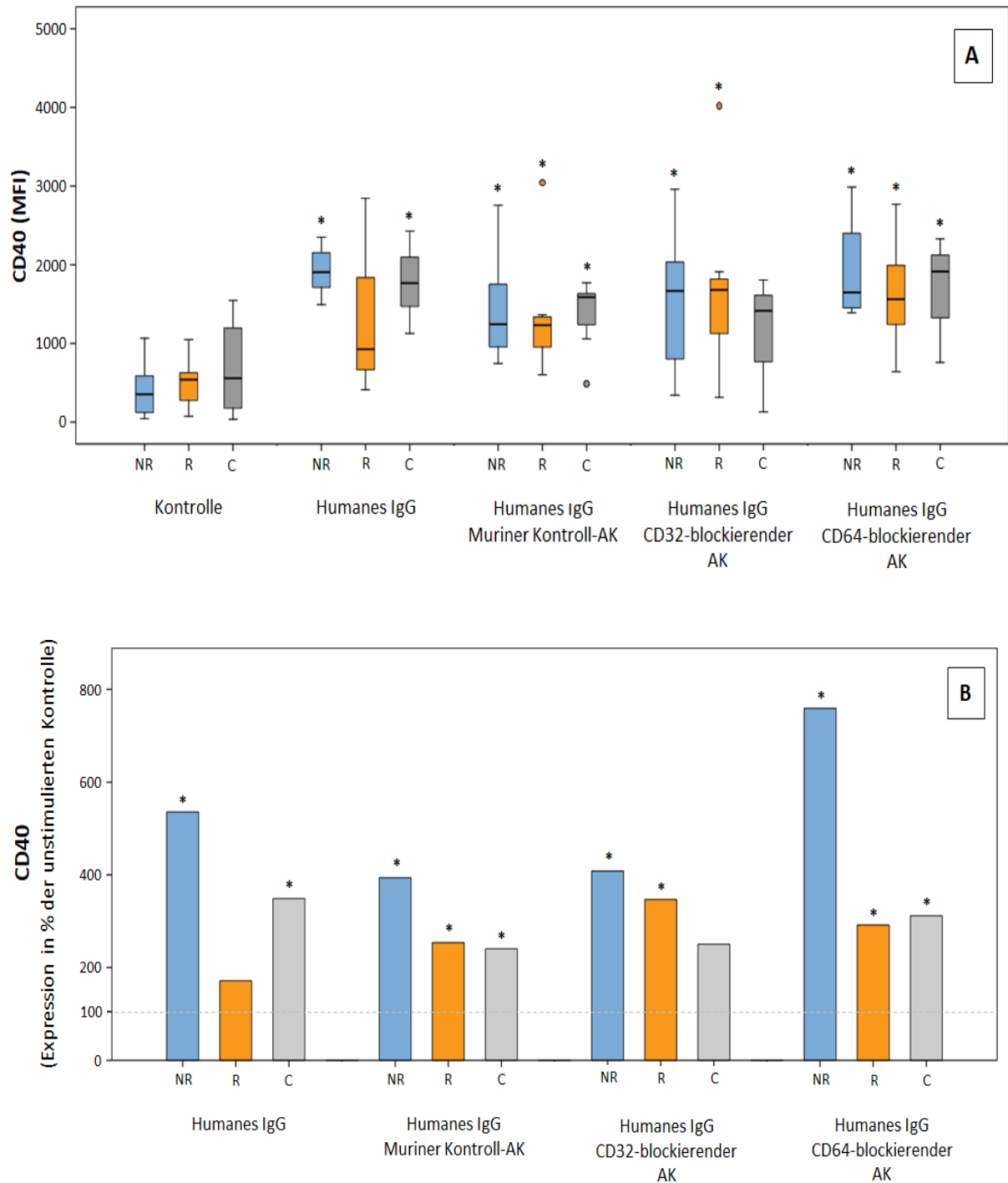


Abb. 3-6: CD 40 - Expression der mDC in der Zellkultur

A als Absolutwert

B im Vergleich zum Kontrollansatz (% Kontrolle)

MFI (mittlere Fluoreszenzintensität), **NR** (Nieraucher), **R** (Raucher), **C** (COPD-Patienten)

CD 86

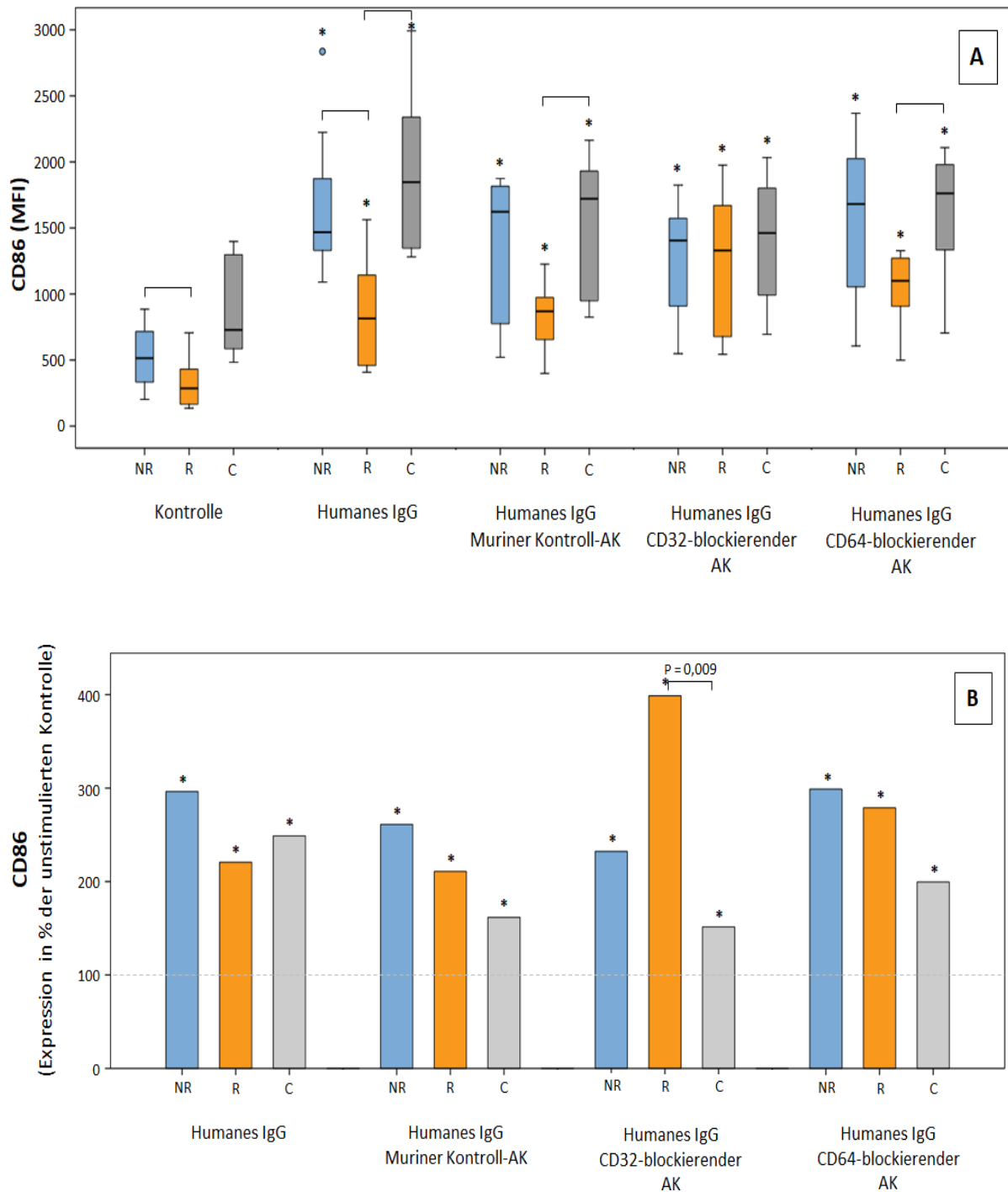


Abb. 3-7: CD 86 - Expression der mDC in der Zellkultur

A als Absolutwert

B im Vergleich zum Kontrollansatz (% Kontrolle)

MFI (mittlere Fluoreszenzintensität), **NR** (Nieraucher), **R** (Raucher), **C** (COPD-Patienten)

CD 83

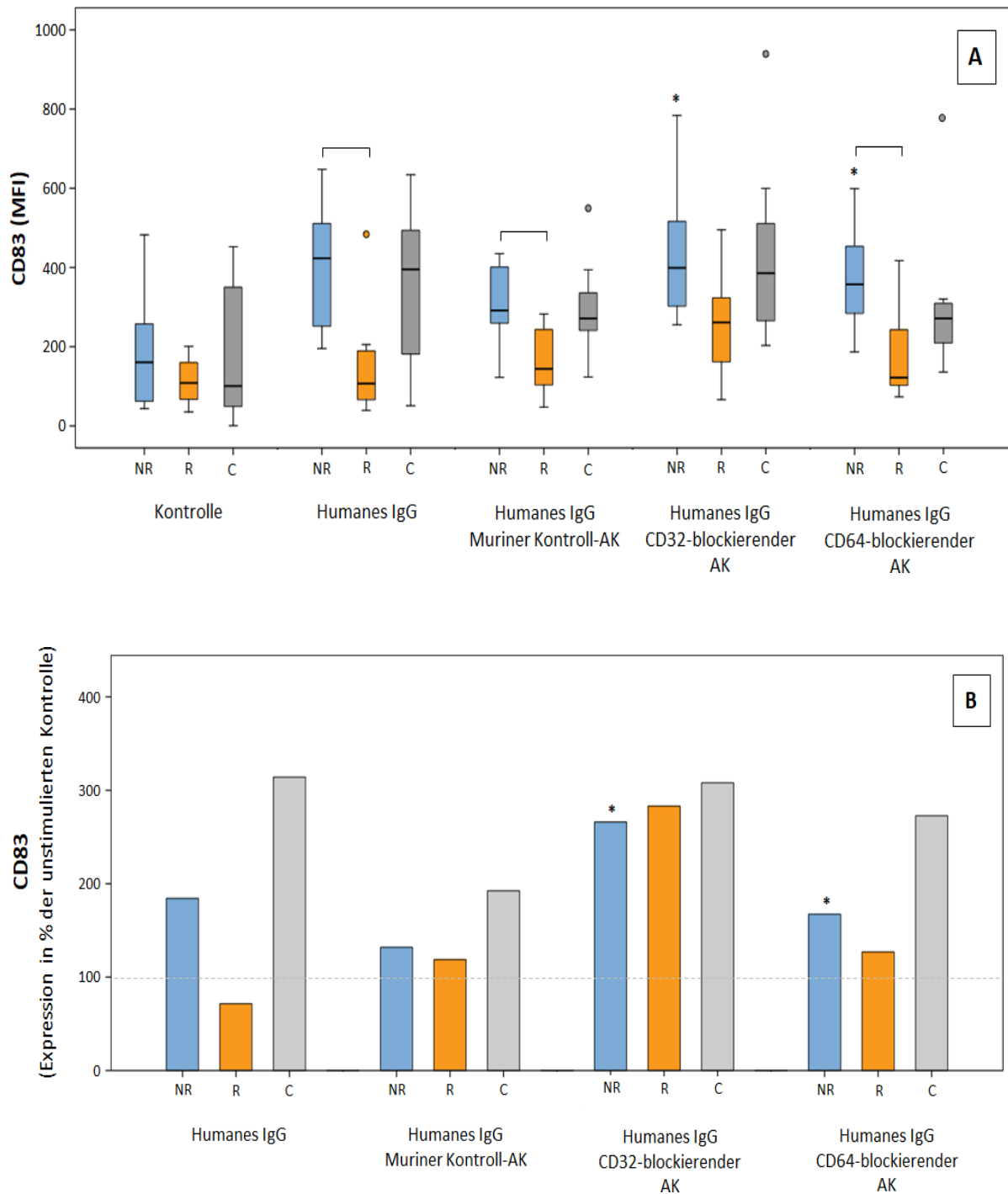


Abb. 3-8: CD 83 - Expression der mDC in der Zellkultur

A als Absolutwert

B im Vergleich zum Kontrollansatz (% Kontrolle)

MFI (mittlere Fluoreszenzintensität), **NR** (Nieraucher), **R** (Raucher), **C** (COPD-Patienten)

HLA-DR

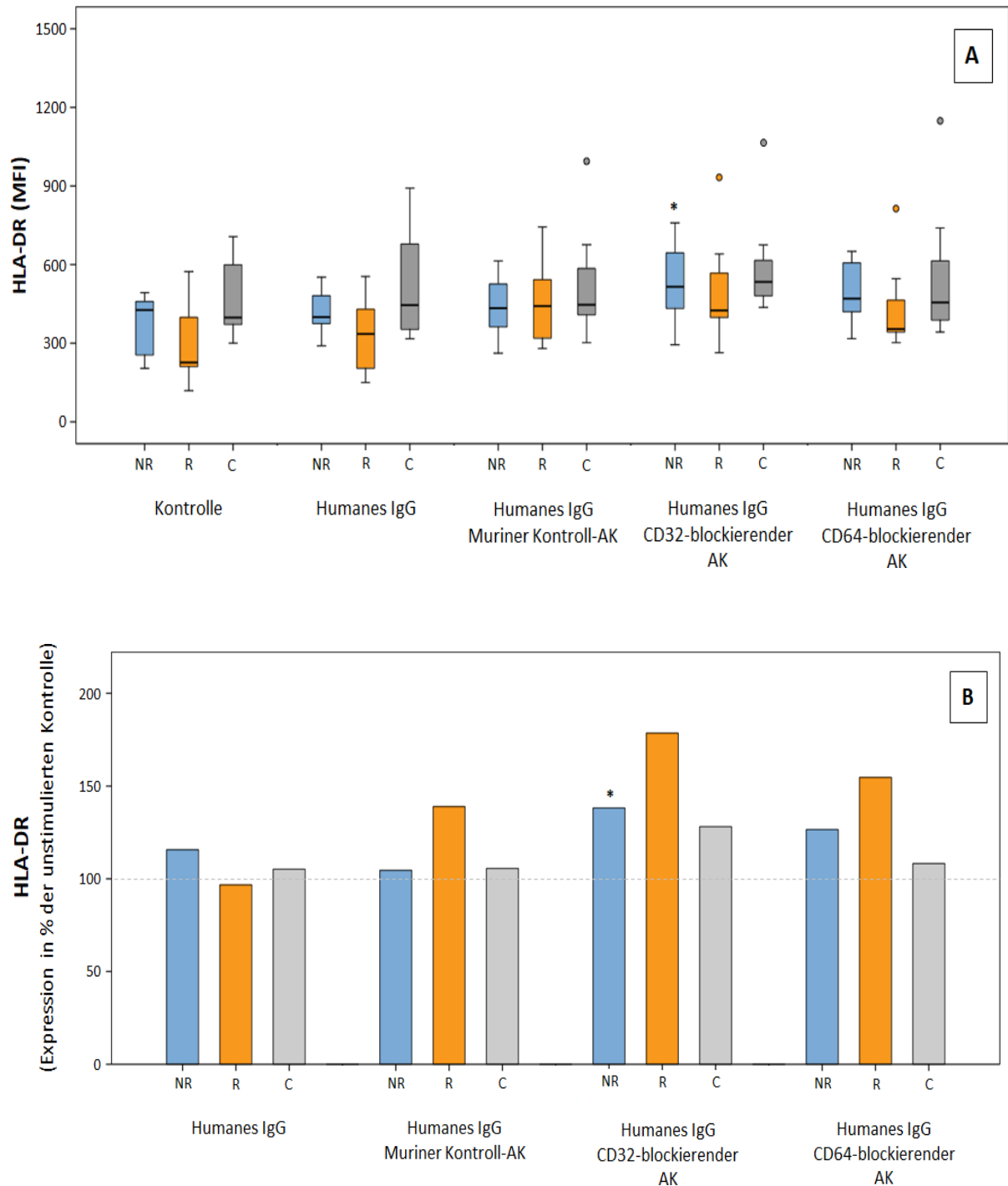


Abb. 3-9: HLA-DR - Expression der mDC in der Zellkultur

A als Absolutwert

B im Vergleich zum Kontrollansatz (% Kontrolle)

MFI (mittlere Fluoreszenzintensität), **NR** (Nieraucher), **R** (Raucher), **C** (COPD-Patienten)

3.2.3.1 Zellstimulation mit humanem Immunglobulin G

Stimulationen mit Immunglobulin G führten bei Nierauchern und COPD-Patienten zu einem signifikanten Anstieg der Expression von CD80, CD40 und CD86. Dieser Anstieg war bei der Rauchergruppe nicht zu verzeichnen. (Abb. 3-5, Abb. 3-6, Abb. 3-7)

Bezüglich des Reifemarkers CD83 ergab sich ein ähnlicher Trend für Nieraucher und COPD-Patienten. Dieser war jedoch nicht signifikant. (Abb. 3-8)

Die Expression von HLA-DR wurde durch die IgG-Stimulation in keiner der drei Probandengruppen signifikant beeinflusst. (Abb. 3-9)

3.2.3.2 Zellstimulation mit humanem Immunglobulin G unter Blockade von CD32 und CD64

Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses der IgG-Rezeptoren CD32 und CD64 wurden diese Rezeptoren während der IgG-Stimulation durch spezifische, murine Antikörper geblockt. Als Kontrolle wurde in einem weiteren Ansatz ein unspezifischer muriner Kontroll-Antikörper hinzugefügt. Im Vergleich zu den Kulturen mit Kontroll-Antikörpern zeigte sich in den Kulturen mit Anti-CD32-Antikörpern und Anti-CD64-Antikörpern kein signifikanter Unterschied in der Expression von CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR in den drei Probandengruppen. (Abb. 3-5, Abb. 3-6, Abb. 3-7, Abb. 3-8, Abb. 3-9)

4 DISKUSSION

Dies ist die erste Studie, die sich mit der Regulation der Immunglobulin-Rezeptoren auf DC von Patienten mit COPD beschäftigt. Es wurden sowohl die Blut-Immunglobulin-Konzentrationen als auch die Expressionen der Immunglobulin-Rezeptoren auf myeloiden dendritischen Zellen des Blutes von Patienten mit COPD untersucht. Zudem wurden in Zellkulturen DC mit Immunglobulinen stimuliert und hinsichtlich resultierender Veränderungen der Expression bestimmter Oberflächenmarker analysiert. Wir konnten zeigen, dass bei Rauchern und COPD-Patienten erniedrigte Blut-Konzentrationen des Gesamt-IgG und von IgG₁ vorliegen. Die Expression der entsprechenden Immunglobulin-Rezeptoren CD32 und CD64 auf dendritischen Zellen war bei Rauchern und COPD-Patienten erhöht. Es konnte ein COPD-spezifischer Anstieg der CD32-Expression ermittelt werden. Nichtsdestotrotz wurden hinsichtlich der Stimulierbarkeit der Expression von bestimmten DC-Oberflächenmarkern durch Immunglobuline keine Unterschiede zwischen den Probandengruppen festgestellt.

4.1 Validität der untersuchten Probandengruppen

In der vorliegenden Arbeit wurden in zwei separaten Studien jeweils drei Gruppen von Teilnehmern verglichen. Die Gruppen setzten sich aus lungengesunden Nierauchern, Rauchern ohne nachweisbare Atemwegs- oder Lungenerkrankungen und Patienten mit einer manifesten COPD zusammen. Die Nieraucher- und Rauchergruppen fungierten als Kontrollgruppen, deren Probanden nur bei fehlender Diagnose jedweder Lungenerkrankungen rekrutiert wurden. Die Experimentalgruppe bestand aus Patienten mit COPD der spirometrischen Schweregrade GOLD II bis IV. Um eine mögliche Einflussnahme auf das Immunsystem auszuschließen, wurde in beiden Studien darauf geachtet, dass keiner der Studienteilnehmer an einer malignen Erkrankung, Autoimmunerkrankung oder aktiven Infektionserkrankung litt. Aus selbigem Grund führte die Einnahme systemischer, immunmodulatorischer Medikamente innerhalb der letzten vier Wochen zum Ausschluss von der Studie. Dennoch konnten Unterschiede zwischen Experimental- und Kontrollgruppen hinsichtlich ihrer Dauermedikation und Begleiterkrankungen nicht vermieden werden, sodass daraus resultierende Effekte auf laborchemische Parameter und Markerexpressionen nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten.

Um die Vergleichbarkeit der Probandengruppen innerhalb der klinischen Studie und der Zellkulturstudie gewährleisten zu können, wurden Teilnehmer rekrutiert, die in Bezug auf das Geschlechterverhältnis und das Alter weitgehend übereinstimmten. Lediglich das Alter zwischen Nierauchern und COPD-Patienten der Zellkulturstudie zeigte bei Medianwerten von 51 und 59 Jahren einen signifikanten Unterschied. Kürzlich publizierte Daten von Garbe et al. zufolge, hatten weder das Alter, das Geschlecht noch der BMI einen Einfluss auf die Zahl der mDC und ihrer Oberflächenmarker CD32, CD64, CD40 und CD86 [124]. Daher ist ein Einfluss des Altersunterschiedes auf die Ergebnisse als unwahrscheinlich anzusehen.

Bezüglich der Packungsjahre (pack years) der Raucher und COPD-Patienten fand sich kein Unterschied.

Auch wenn davon auszugehen ist, dass durch die vorliegenden Gruppen eine exakte Trennung zwischen Gesunden und Erkrankten möglich war, ist für zukünftige Untersuchungen eine noch genauere Differenzierung der COPD-Gruppe wünschenswert. So würde nicht nur eine COPD-Stadien-orientierte Unterteilung sinnvoll erscheinen. Auch der Vergleich von COPD-Patienten, die noch aktiv rauchen mit denen, die bereits seit Jahren nicht mehr rauchen, wäre interessant. Ebenso wäre es denkbar, eine Stratifizierung hinsichtlich der verwendeten inhalativen Medikation vorzunehmen. Jede dieser genannten Maßnahmen zur genaueren Charakterisierung der untersuchten Population würde jedoch erheblich höhere Fallzahlen und materiellen sowie methodischen Aufwand erfordern, der im Rahmen dieser Studie nicht vorgesehen war. Für zukünftige Studien zu dieser Fragestellung wäre die Berücksichtigung dieser Aspekte sinnvoll.

4.2 Methodenkritik

Magnetische Zellseparation (MACS)

Die von S. Miltenyi et al. entwickelte, magnetische Zellseparation ist eine hochmoderne und gut etablierte Methode zur Isolation und Analyse rarer und fragiler Zellen [125]. In Abhängigkeit des fokussierten Zelltyps erzielt sie Reinheiten von bis zu 99 % [126]. In der hier vorliegenden Studie wurden Reinheiten von 80-99 % erreicht. Daher kann ein Einfluss anderer Zellen auf die mDC nicht ausgeschlossen werden. Andererseits hat diese Methode den Vorteil, dass nicht nur CD1c (BDCA-1)- und CD141 (BDCA-3)-positive mDC, sondern alle mDC-Populationen aus peripheren, mononukleären Zellen (PBMC) angereichert werden können [127]. Miltenyi et al. zufolge hat die MACS keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit und Proliferationsrate der untersuchten Zellpopulation [126, 128]. Schon aufgrund des gewählten Verfahrens der Negativselektion ist der Kontakt der mDC zu den MicroBeads und eine daraus resultierende Beeinflussung der Zellen als unwahrscheinlich zu betrachten. Selbst im Falle eines solchen systematischen Fehlers wäre anzuführen, dass alle untersuchten Zellen den gleichen Prozess durchliefen und eine Einflussnahme somit jede Zelle in gleichem Maße betroffen hätte.

Zellkultur

Die Reduktion der komplexen in-vivo-Situation im Rahmen der Zellkultivierung soll die Analyse zellulärer Prozesse vereinfachen. Da sich die Zellkultur in Abhängigkeit der gewählten Kulturbedingungen adaptiv verändert, ergibt sich indes das Ziel, diese bestmöglich an die Situation im Organismus anzugleichen. Demzufolge können fehlerhafte Inkubationsbedingungen wie zum Beispiel der Einsatz ungeeigneter Zellkulturmedien sowie die Kontamination durch unsteriles Arbeiten das Zellwachstum negativ beeinflussen.

Im Fall der vorliegenden Arbeit wurde ein flüssiges Nährmedium gewählt, welches für die Arbeit mit dendritischen Zellen etabliert ist. Die Zugabe einer gängigen Antibiotikakombination aus Penicillin und Streptomycin sollte das Wachstum unerwünschter Mikroorganismen verhindern. Um die reale Umgebung der Zellen bestmöglich nachzubilden, wurde das Medium mit Patientenserum angereichert. Darin enthaltene Lipide, Zucker, Vitamine, Spurenelemente und Mineralien fungierten als Nährstoffquellen. Natürliche Adhäsionsfaktoren wie Fibronectin unterstützen die Anheftung der Zellen an das Kulturgefäß.

Dennoch bleibt die in-vitro-Kultivierung ein künstliches System mit artifiziellen Bedingungen und einer erheblichen Simplifizierung der Zustände, die im Organismus herrschen. Komplexere Interaktionen wie organspezifische Zell-Zell-Interaktionen oder Costimulationen sind durch diese Methode oft nicht adäquat abzubilden. Daher muss die Gültigkeit der erhaltenen Versuchsergebnisse oftmals in in-vivo-Studien verifiziert werden.

Um unspezifische Antikörpereffekte in den Ansätzen mit Anti-CD32/CD64-Antikörpern ausschließen zu können, wurde ein Ansatz mit einem Isotypkontroll-Antikörper mitgeführt.

Durchflusszytometrie

Für die Messung der Oberflächenmarker CD32, CD64, CD80, CD40, CD86, CD83 und HLA-DR auf myeloiden, dendritischen Zellen stellte die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie die Methode der Wahl dar. Seit langem wird sie erfolgreich in der Forschung eingesetzt und fand aufgrund ihrer Eigenschaft, große Zellpopulationen in relativ kurzer Zeit zu charakterisieren, rasch Eingang in die diagnostische Routine. In der pneumologischen Abteilung der Universität Rostock wurde das Verfahren bereits standardmäßig in einer Reihe von Experimenten zu humanen dendritischen Zellen des peripheren Blutes und der bronchoalveolären Lavage eingesetzt. [112, 124, 126, 129–131]

Um unspezifische Antikörpereffekte und die Autofluoreszenz der Zellen ausschließen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Ansatz mit einem Isotypkontroll-Antikörper mitgeführt.

4.3 Immunglobulin G im Serum bei der COPD

Konzentrationen der Serumimmunglobuline werden im klinischen Alltag routinemäßig bestimmt, da sie wesentliche Informationen über den humoralen Immunstatus liefern. Für gewöhnlich werden niedrige Spiegel mit Immundefizienzen und Erhöhungen mit Lebererkrankungen, Infektionen, Malignomen und hämatologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht [132]. Darüber hinaus konnten diverse Studien zeigen, dass auch chronisch-entzündliche Erkrankungen wie zum Beispiel die rheumatoide Arthritis (RA) [113], die Sarkoidose [133], der systemische Lupus erythematodes (SLE) [114], das Sjögren-Syndrom (SS) [134] und die

chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) [115] mit einer Veränderung der Serum-Immunglobulin-Konzentration einhergehen.

Über Immunglobulin-Konzentrationen im Serum liegen für die COPD, welche ebenfalls zu den chronisch-entzündlichen Erkrankungen zählt, bis dato nur wenige Informationen vor. Im klinischen Teil dieser Studie ergaben sich für Raucher und COPD-Patienten im Vergleich zu Nier Rauchern signifikant niedrigere Konzentrationen des Gesamt-IgG und des IgG₁.

Mit Ausnahme der CED werden die oben erwähnten chronisch-entzündlichen Erkrankungen im Allgemeinen mit erhöhten Immunglobulin-Konzentrationen assoziiert. Bei den CED wurden in unterschiedlichen Publikationen sowohl Anstiege als auch Abfälle der Immunglobuline ermittelt. [115, 135]

Es stellt sich die Frage, warum es im Rahmen der COPD nicht - wie für andere chronisch-entzündliche Erkrankungen typisch - zu einem Anstieg der Immunglobuline kommt.

Ein möglicher ätiologischer Unterschied zwischen der COPD und den mit einem Immunglobulinanstieg assoziierten Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis (SLE, SS, RA) stellt die Bedeutung der autoimmunen Komponente dar. Während die Autoinflammation bei diesen Erkrankungen als Ursache weitestgehend akzeptiert wird, ist die Bedeutung von Autoimmunität in der Krankheitsentstehung der COPD sehr umstritten [136, 137]. Die erhöhte Produktion von Auto-Antikörpern bei rheumatologischen Erkrankungen wäre als Ursache für den Anstieg der Immunglobulin-Konzentrationen im Serum anzuführen [132, 138, 139]. Dahingegen spielt die Produktion derartiger Antikörper bei der COPD nach heutigem Kenntnisstand keine maßgebliche Rolle. Das Fehlen dieses Aspekts könnte eine Erklärung für den ausbleibenden Immunglobulinanstieg im Rahmen der COPD sein.

Studien zur Sarkoidose vermuten, dass eine erhöhte Zahl aktivierter T-Lymphozyten in der Lunge von Erkrankten die Ursache für die erhöhten Immunglobulinspiegel ist [140]. Für die COPD hingegen finden sich keine Daten, die eine lokale, lymphozytenvermittelte Immunglobulinproduktion belegen.

Ein Mechanismus, der den Immunglobulinabfall bei COPD-Patienten erklären könnte, wäre die Verschiebung der Immunglobuline zwischen den Kompartimenten Lunge und Blut. Es ist denkbar, dass es in den Atemwegen (Kompartiment Lunge) zu einer Akkumulation der Antikörper kommt, die durch die gesteigerte Exsudation im Rahmen der chronischen Entzündung

hervorgerufen wird. Gestützt wird diese Vermutung durch den Nachweis von IgG-Ablagerungen in den Lungenexplantaten von Patienten mit schwerer COPD (Abb. 4-1) [141]. Zudem konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen chronisch-entzündlicher Lungenerkrankungen zu einem gesteigerten Transport von schützenden Antikörpern in die Alveolen der Lungen von Mäusen kommt [142].

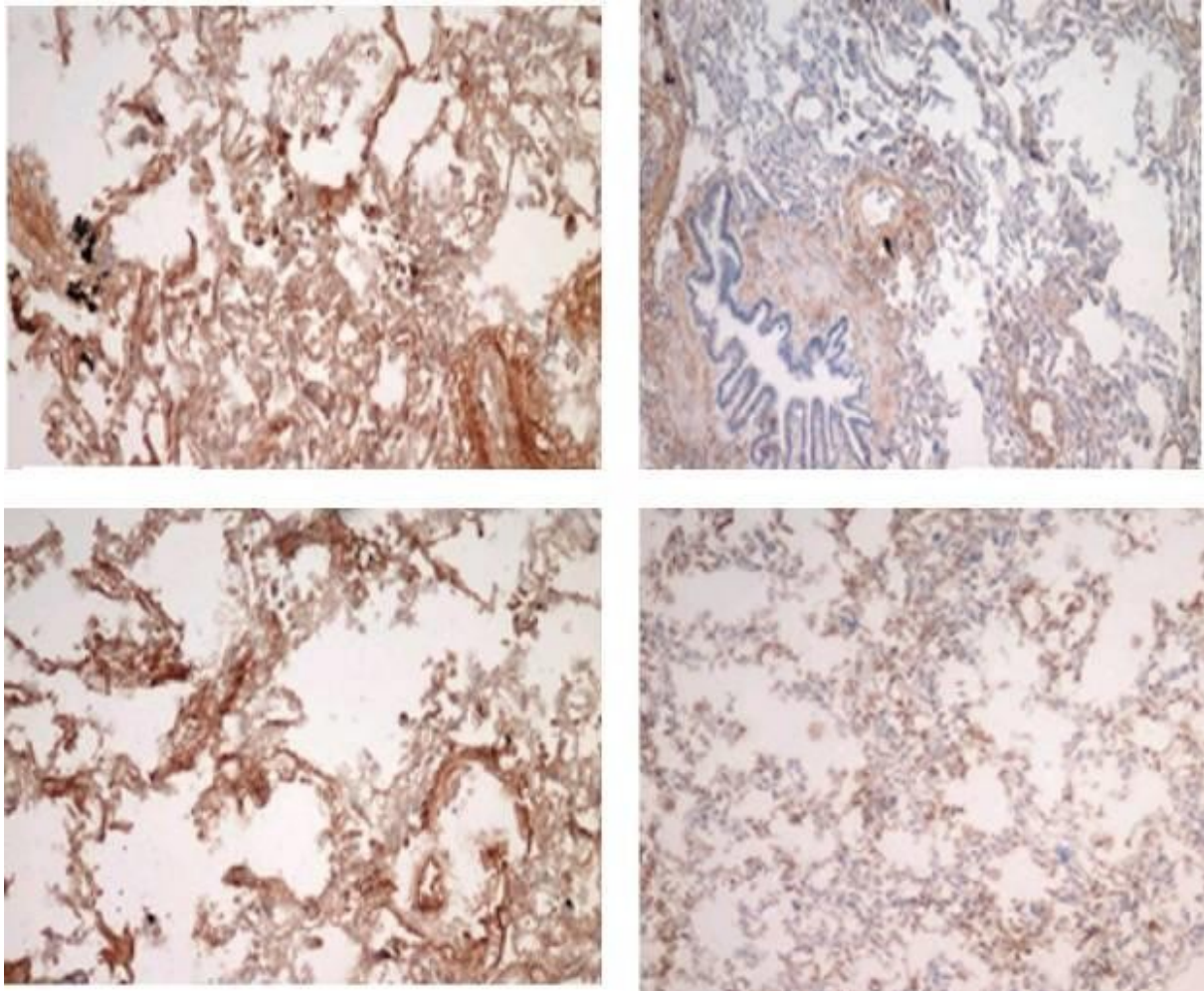


Abb. 4-1: Immunhistochemie – Akkumulation von IgG in den Alveolarsepten und kleinen Atemwegen von COPD-Patienten

Die linksseitigen Abbildungen zeigen die IgG-Ablagerungen in explantierten Lungenabschnitten von COPD-Patienten. (dunkelrote/-braune Färbung) Die rechtsseitigen Abbildungen stellen eine normale Kontrolle (oben) und die Isotypenkontrolle (unten) dar. [141]

Die Erkenntnis, dass sowohl bei Rauchern als auch bei COPD-Patienten erniedrigte Immunglobulinkonzentrationen vorliegen, weist auf einen möglichen Einfluss des Zigarettenrauchens auf die Immunglobulin-Konzentrationen hin. Das Zigarettenrauchen wurde bei 42 Probanden

der COPD-Gruppe bereits vor dem Einschluss in die Studie eingestellt. Die gesamte Rauchergruppe (n=21) und zwölf COPD-Erkrankte waren zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses noch aktive Raucher. Alle COPD-Patienten und Raucher wiesen ein Minimum von fünf Packungsjahren auf. Der Vergleich der Serumkonzentrationen von Gesamt-IgG und IgG₁ zwischen den COPD-Patienten, die noch aktiv rauchten (n=12) und den COPD-Patienten, die das Rauchen aufgegeben hatten (n=42), ergab keine signifikanten Unterschiede. Würden die erniedrigten Serumspiegel nur bei den aktiv rauchenden Patienten und nicht bei den ehemaligen Rauchern zu beobachten gewesen sein, wäre dies ein Hinweis dafür gewesen, dass die Erniedrigung der Immunglobulinspiegel eher mit dem aktiven Rauchen assoziiert und nicht COPD-spezifisch ist. Da die IgG-Senkung in diesem Fall zusätzlich auch auf die Ex-Raucher zutrifft, kann man die Senkung zum einen auf einen ehemals stattgefundenen Tabakkonsum zurückführen. Zum anderen wäre die COPD in diesem Fall als alleiniger, beziehungsweise zusätzlicher Auslöser denkbar. Um diese Frage abschließend zu klären, wäre eine Studie zu Immunglobulinen bei COPD-Patienten ohne Raucheranamnese notwendig. Ergebnisse von Gonzalez-Quintela et al. stützen die hier erhobenen Daten, da auch sie bei Rauchern geringere Serum-IgG-Konzentrationen als bei Nichtrauchern ermittelten [143].

Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen Rauchern und COPD-Patienten stellt die systemische Inflammation dar, welche Krüger et al. zufolge bei Rauchern zu einem frühen Zeitpunkt beobachtet werden [144] und ebenfalls als Ursache des verringerten Serumspiegels diskutiert werden kann. [145]

Hinsichtlich der Überlegungen zu den Ursachen des Immunglobulinabfalls stellt sich die Frage nach Charakteristika, die der COPD- und Raucher-Gruppe gemein sind, potenziellen Einfluss auf Immunglobulin-Konzentrationen haben könnten und gleichzeitig nicht auf die Nierauchergruppe zutreffen. Da diese Kriterien auf die Parameter Alter, Geschlecht, BMI und Lungenfunktionswerte nicht zutreffen, werden diese nicht als Auslöser des Immunglobulinabfalls angenommen.

O'Keeffe et al. haben in einer Untersuchung von 58 COPD-Erkrankten ebenfalls erniedrigte Werte für Gesamt-IgG und IgG₁ feststellen können und spekulierten, dass die Konzentrationsabfälle am Voranschreiten bzw. an der Verschlechterung der COPD beteiligt sein könnten

[146]. Auch eine erhöhte Anfälligkeit für Infekte kann als mögliche Folge der verringerten Serumwerte diskutiert werden. Die Studie von McCullagh et al. postulierte, dass der Antikörpermangel potenzieller Risikofaktor für eine höhere Frequenz an COPD-Exazerbationen sein könnte [147].

Eine andere Publikation fand im Serum von COPD-Patienten hingegen normale oder höhere Immunglobulinkonzentrationen [148]. Abschließend bleibt festzustellen, dass die Entstehung der veränderten Konzentrationen der Immunglobuline bei der COPD nicht vollständig verstanden ist und weiterer Untersuchungen bedarf.

4.4 Immunglobulin-Rezeptoren bei der COPD

4.4.1 Mögliche Bedeutung von CD32 als IgG-Rezeptor bei der COPD

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchung myeloider dendritischer Zellen fiel ein für COPD-Patienten spezifischer Anstieg von CD32 auf, welcher als Rezeptor des Immunglobulin G fungiert. Die Fc γ -Rezeptoren spielen bei der Initiierung und Regulation vieler immunologischer und entzündlicher Prozesse eine wichtige Rolle. Genetische Varianten wurden mit zahlreichen Autoimmun- und Infektionskrankheiten assoziiert [149]. Genomweite Assoziationsstudien sowie die Analyse einzelner Fc-Rezeptor-Polymorphismen zeigen eine Assoziation mit Erkrankungen wie den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, der rheumatoiden Arthritis, den Vaskulitiden und dem systemischen Lupus erythematoses [149–152]. So stellte sich zum Beispiel heraus, dass die Interaktion zwischen IgG-Immunkomplexen und Fc γ -Rezeptoren einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung der chronischen Entzündung im Rahmen des systemischen Lupus erythematoses leistet [153]. Eine erhöhte Expression diverser Fc γ -Rezeptoren konnte darüber hinaus auf neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und PBMC bei Karzinompatienten, HIV-Infizierten und Patienten mit rheumatoider Arthritis oder metabolischem Syndrom festgestellt werden [154–157].

Die Korrelation zwischen einem Liganden und seinem Rezeptor kann prinzipiell positiv oder negativ sein. Eine positive Korrelation findet sich zum Beispiel zwischen den Konzentrationen von IgE und IgE-Rezeptoren beim Asthma bronchiale. Diese Ligand-Rezeptor-Interaktion kann

schwere inflammatorische Prozesse auslösen, die sich in lebensbedrohlichen allergischen Reaktionen manifestieren. Neben weiteren Studien wiesen Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe (Stoll et al.) auf plasmazytoiden dendritischen Zellen von COPD- und Asthma-Patienten erhöhte Konzentrationen des Fc_ϵ -Rezeptor I nach. Ein Anstieg des IgE im Serum ging in diesem Fall mit einem Anstieg der Expression des Fc_ϵ -Rezeptor I einher. [158]

In Anbetracht der Erkenntnis über erniedrigte IgG-Konzentrationen und erhöhte CD32-Expressionen auf mDC kann über eine negative Korrelation zwischen IgG und den Immunglobulin-Rezeptoren bei COPD-Patienten spekuliert werden.

Diese Vermutung konnte durch eine Analyse, in der sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,022$) zwischen den Konzentrationen der Immunglobuline (IgG_2 , IgG_3) und CD32 ergab, bestärkt werden. Ebenso zeigte sich eine Tendenz zur negativen Korrelation zwischen CD32 und Gesamt-IgG ($p=0,079$). Ähnliche Tendenzen in der Korrelation zwischen Immunglobulin G und Immunglobulin-Rezeptoren waren bei Rauchern und Nierauchern nicht festzustellen.

Eine mögliche Erklärung für die Hochregulation des Immunglobulin-Rezeptors CD32 bei der COPD wäre demzufolge die kompensatorische Gegenregulation der Zellen als Antwort auf die Senkung des IgG im Serum. Möglicherweise kann die Abnahme des verfügbaren IgG durch eine Erhöhung der Rezeptordichte kompensiert werden. So zeigte sich im Rahmen chronisch-entzündlicher, neurodegenerativer Prozesse eine erhöhte Expression von aktivierenden Fc_γ -Rezeptoren auf Mikrogliazellen [159].

4.4.2 Mögliche Bedeutung von CD32 für die Regulation von bestimmten Oberflächenmarkern bei der COPD

In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass die CD32-Expression die funktionellen Kapazitäten unterschiedlichster Zellen beeinflussen kann. Beispielsweise werden Annahmen über Auswirkungen auf die Phagozytoseaktivität unter anderem durch Beobachtungen von Fanger et. al. bestärkt, denen zufolge dendritische Zellen CD32-vermittelt partikuläre Substanzen aufnehmen [90]. Eine veränderte Zytokinausschüttung kann aufgrund von Publikationen vermutet werden, die über die Kontrolle der gewebe- und pathogenspezifischen Zytokinproduktion durch Fc_γ -Rezeptoren berichten [160]. Kim et al. fanden heraus, dass sowohl das Fortleben als

auch die Apoptose eosinophiler Granulozyten durch die Ligandenbindung an CD32 bestimmt werden kann [161].

Demzufolge könnte es durch die verstärkte CD32-Expression bei myeloiden dendritischen Zellen von COPD-Patienten zur Beeinflussung der Phagozytoseaktivität, der Zytokinausschüttung, der Lebensdauer der Zellen und der Oberflächenmarkerexpression kommen (Abbildung 4-1). Von diesen denkbaren Möglichkeiten wurde der letztgenannte Punkt in der vorliegenden Zellkulturstudie untersucht.

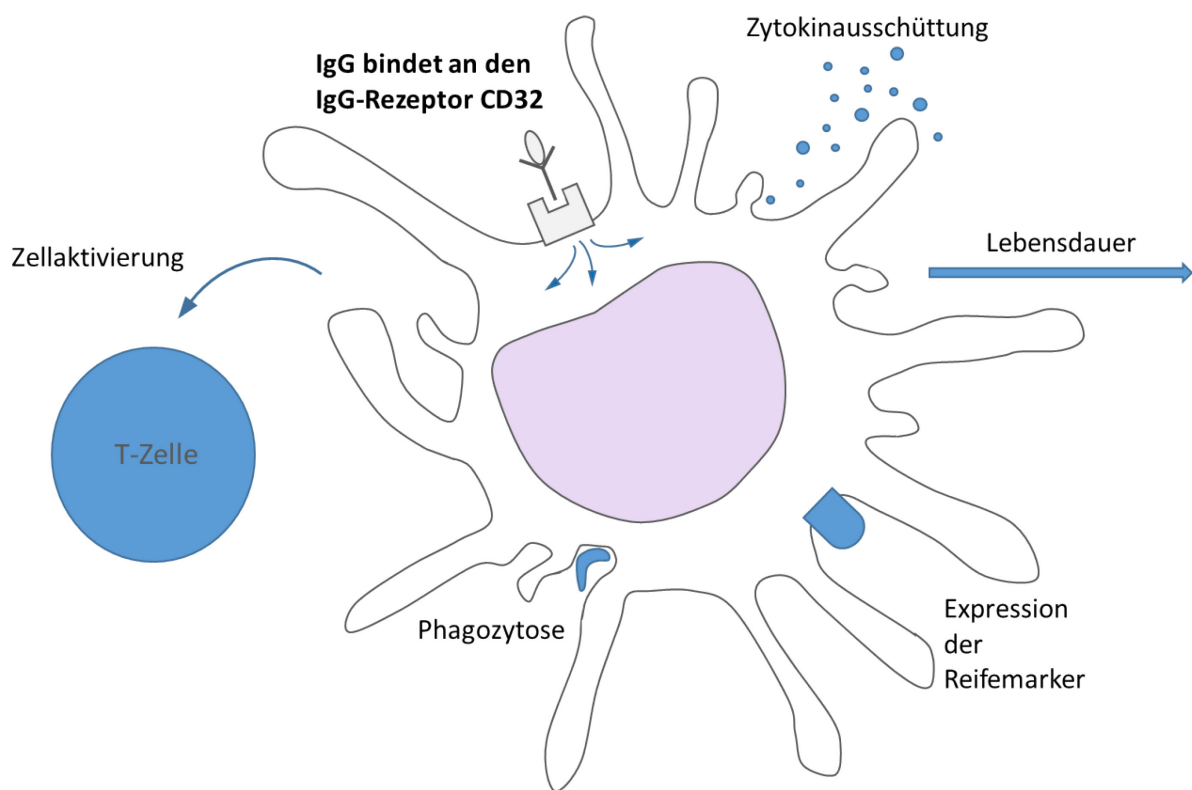


Abb. 4-2: Regulatorische Funktionen des Immunglobulin-Rezeptors

In einer Studie mit von Monozyten-abgeleiteten, dendritischen Zellen (moDC) konnte bereits gezeigt werden, dass die Quervernetzung von CD32 auf moDC und die Bindung von humanem IgG an CD32 die Reifung der dendritischen Zelle induzieren kann [162, 163]. Während dieses Reifungsprozesses steigt die Expression von MHCII-Molekülen (HLA-DR), costimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86 sowie von Antigenen mit unbekannter Funktion wie

CD83 [164, 165]. Jeder der fünf genannten Oberflächenantigene gilt als Reifemarker der dendritischen Zellen [165].

In unseren zellkulturellen Studien konnten wir keinen Einfluss einer IgG-Stimulation von CD32 auf die Expression von Oberflächenmarkern bei mDC von Patienten mit COPD nachweisen. Angesichts der kleinen Gruppengrößen von sieben bis acht Teilnehmern kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Effekte hier nicht detektiert wurden.

4.4.3 Mögliche Bedeutung von CD32 als CRP-Rezeptor bei der COPD

Das CRP ist einer der etabliertesten serologischen Marker für das Vorliegen einer systemischen Inflammation, im Speziellen auch bei der COPD [166]. CD 32 (Fc γ -Rezeptor II) gilt als Hauptrezeptor für das CRP auf Leukozyten. Man konnte nachweisen, dass das CRP die Oberflächenexpression des Fc γ -Rezeptors signifikant steigerte [121]. Dreschler et al. bestätigen den gleichsinnigen Anstieg von CRP und Immunglobulin-Rezeptoren in Patienten mit Pneumonie [167].

In unserer Studie zeigte sich nicht nur das CRP, sondern auch IL-6 im Serum von COPD-Patienten erhöht. Es ist denkbar, dass auch andere proinflammatorische Marker wie IL-6, IL-12 oder TNF-alpha eine ähnliche Wirkung wie das CRP auf die Rezeptorexpression haben [168]. Devaraj et al. und ihre Arbeit mit humanen Endothelzellen der Aorta deuten darauf hin, dass die biologischen Effekte des CRP über dessen Bindung und Internalisation durch CD32 vermittelt werden könnten [169–171]. Es konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass das CRP via CD32 bei Monozyten zur Apoptose [120] und bei Endothelzellen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und inflammatorischer Mediatoren führen kann [121]. So ist das CRP nicht nur Marker, sondern selbst wichtiger Regulator inflammatorischer Prozesse und fungiert als Mediator bei Komplementaktivierung, Apoptose, Phagozytose, NO-Freisetzung und Zytokinausschüttung.

In Anbetracht dieser Informationen ist es denkbar, dass Entzündungsmarker wie das CRP eine Hochregulation der CD32-Expression auf myeloiden dendritischen Zellen von COPD-Patienten induzieren und über CD32-vermittelte Effekte als Motor der chronischen, systemischen Inflammation bei der COPD agieren. Eine Konkurrenz des CRP und IgG um die Bindungsstelle am

Rezeptor könnte die Immunglobulin-vermittelte Antigenabwehr schwächen und als Ursache für die erhöhte Infektanfälligkeit bei COPD-Erkrankten diskutiert werden [119].

4.5 Hypothese

Die Interaktion des Immunglobulin G und CRP mit dem Immunglobulin-Rezeptor CD 32 auf mDC von Patienten mit einer COPD führt zu funktionellen Veränderungen der mDC und hat somit Einfluss auf die Pathogenese der COPD. Im Vordergrund scheint hier nicht eine veränderte Reifung der mDC zu stehen, sondern möglicherweise eine veränderte Antigenaufnahme und eine veränderte Reaktion auf inflammatorische Signale.

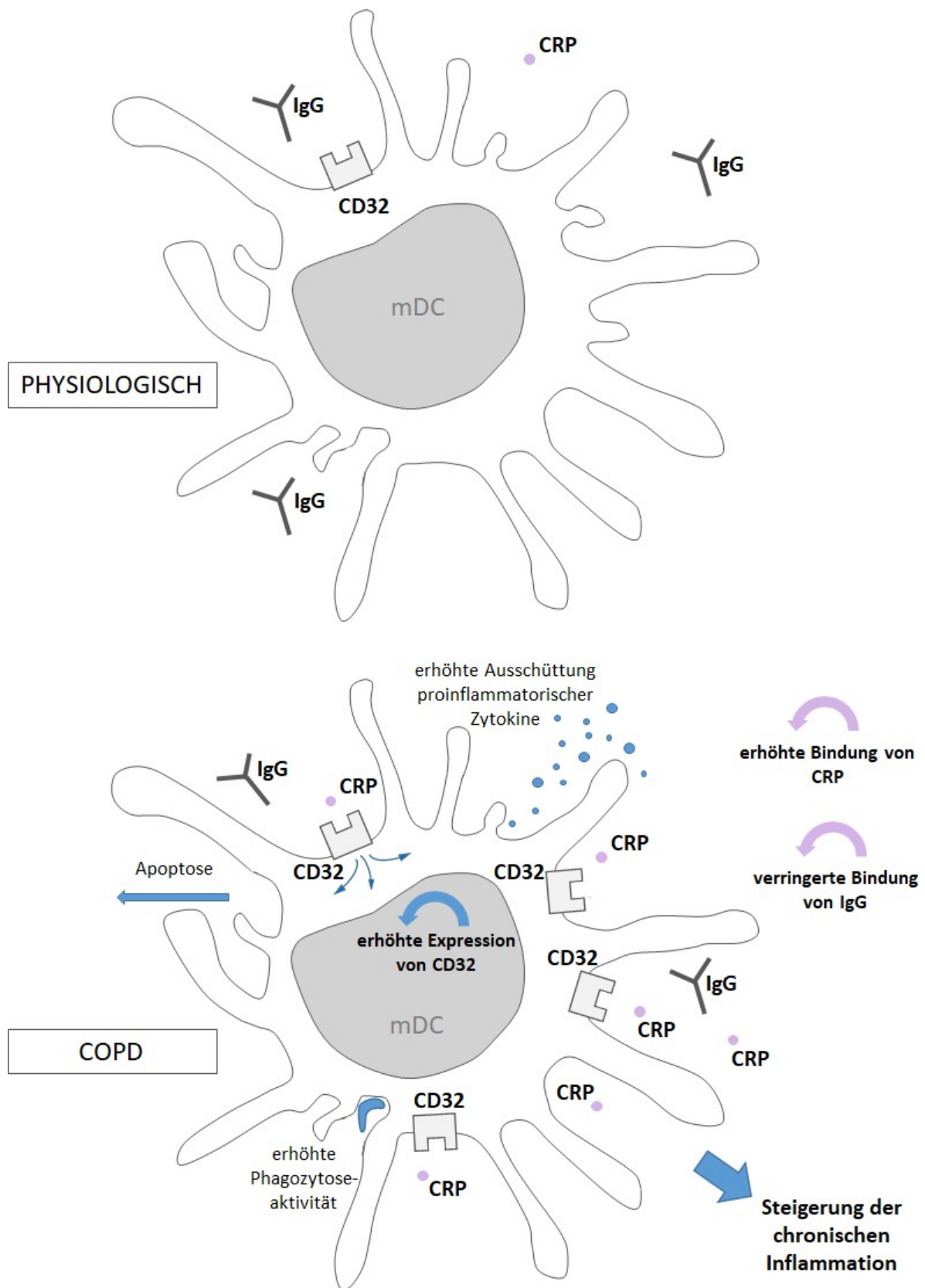


Abb. 4-3: Hypothese zur Pathogenese der COPD

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die COPD zählt zu den führenden Volkserkrankungen und ist die dritthäufigste Todesursache weltweit.

Die Bedeutung von Immunglobulinen und deren Rezeptoren im Rahmen chronisch-entzündlicher Erkrankungen wurde in zahlreichen Studien untersucht. Für die COPD existieren diesbezüglich kaum Daten. In dieser Studie fanden sich sowohl bei Rauchern als auch bei COPD-Patienten erniedrigte Blut-Konzentrationen des Gesamt-IgG und IgG₁.

Dendritische Zellen spielen eine pathogenetische Rolle bei der COPD. Die Bedeutung der IgG-Rezeptoren auf mDC von Patienten mit COPD ist jedoch unbekannt. Die Oberflächenexpression von CD32 und CD64, Rezeptoren des Immunglobulin G, zeigte sich bei der Untersuchung dendritischer Zellen von Rauchern und COPD-Patienten erhöht. Ein COPD-spezifischer Anstieg der CD32-Expression konnte ermittelt werden. Für CD32 zeigte sich bei COPD-Patienten eine negative Korrelation mit IgG₂ und IgG₃ sowie eine Tendenz zur negativen Korrelation mit dem Gesamt-IgG.

Im experimentellen Abschnitt dieser Studie wurde erstmalig die Expression von Reifemarkern auf mDC unter Immunglobulinstimulation untersucht. Es konnten bezüglich der Stimulierbarkeit der Expression von mDC-Reifemarkern, wie z.B. CD83, durch Immunglobuline keine Unterschiede zwischen Nierauchern, Rauchern und COPD-Patienten festgestellt werden.

Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass eine erhöhte Expression des IgG-Rezeptors CD32 auf mDC über die Interaktion mit seinen Liganden IgG und CRP eine pathogenetische Rolle bei der COPD spielen könnte, die sich nicht durch die veränderte Expression von bestimmten mDC-Reifemarkern, sondern durch anderweitig veränderte funktionelle Kapazitäten der mDC, wie z.B. die Zytokinausschüttung, äußert. Weitere funktionelle Studien zu Immunglobulinen und ihren Rezeptoren auf myeloiden dendritischen Zellen bei der COPD sind daher notwendig, um deren Rolle bei der COPD besser zu verstehen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. (1959) Terminology, Definitions, and Classification of Chronic Pulmonary Emphysema and Related Conditions: A Report of the Conclusions of a Ciba Guest Symposium. *Thorax* 14(4):286–299
2. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (2017) Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. <http://www.gold-copd.com>
3. Vogelmeier C, Buhl R, Burghuber O, Criée C-P, Ewig S, Godnic-Cvar J, Hartl S, Herth F, Kardos P, Kenn K, Nowak D, Rabe KF, Studnicka M, Watz H, Welte T, Windisch W, Worth H (2018) Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD). *Pneumologie* 72(4):253–308. doi:10.1055/s-0043-125031
4. Choudhury G, Rabinovich R, MacNee W (2014) Comorbidities and systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* 35(1):101–130. doi:10.1016/j.ccm.2013.10.007
5. Lozano R, Naghavi M, Foreman K et al (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380(9859):2095–2128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0
6. Lopez-Campos JL, Ruiz-Ramos M, Soriano JB (2014) Mortality trends in chronic obstructive pulmonary disease in Europe, 1994-2010: a joinpoint regression analysis. *Lancet Respir Med* 2(1):54–62. doi:10.1016/S2213-2600(13)70232-7
7. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M et al (2012) Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380(9859):2163–2196. doi:10.1016/S0140-6736(12)61729-2
8. Buist AS, Vollmer WM, Sullivan SD, Weiss KB, Lee TA, Menezes AMB, Crapo RO, Jensen RL, Burney PGJ (2005) The Burden of Obstructive Lung Disease Initiative (BOLD): rationale and design. *COPD* 2(2):277–283
9. Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, Gudmundsson G, Welte T, Nizankowska-Mogilnicka E, Studnicka M, Bateman E, Anto JM, Burney P, Mannino DM, Buist SA (2011)

- COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study. *Chest* 139(4):752–763. doi:10.1378/chest.10-1253
10. Gillissen A, Welte T (Hrsg) (2014) Weißbuch Lunge 2014. Herausforderungen, Zukunftsperspektiven, Forschungsansätze ; zur Lage und Zukunft der Pneumologie in Deutschland, 1. Aufl. Frischtexte Verl., Herne, Westf
 11. Mannino DM, Buist AS (2007) Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 370(9589):765–773. doi:10.1016/S0140-6736(07)61380-4
 12. Studnicka M (2005) Epidemiology and prevention of COPD. *Wien Med Wochenschr* 155(5-6):78–80. doi:10.1007/s10354-005-0151-y
 13. Buist AS, Vollmer WM, McBurnie MA (2008) Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part I. The burden of obstructive lung disease (BOLD) initiative. *Int J Tuberc Lung Dis* 12(7):703–708
 14. Chen R (2008) Passive smoking exposure and risk of COPD in China. *Lancet* 371(9608):201; author reply 201-2. doi:10.1016/S0140-6736(08)60126-9
 15. Mannino DM (2002) COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest* 121(5 Suppl):121S-126S
 16. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman EK, Balmes JR (2010) An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 182(5):693–718. doi:10.1164/rccm.200811-1757ST
 17. Paulin LM, Diette GB, Blanc PD, Putcha N, Eisner MD, Kanner RE, Belli AJ, Christenson S, Tashkin DP, Han M, Barr RG, Hansel NN (2015) Occupational exposures are associated with worse morbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 191(5):557–565. doi:10.1164/rccm.201408-1407OC
 18. Gan WQ, Fitzgerald JM, Carlsten C, Sadatsafavi M, Brauer M (2013) Associations of ambient air pollution with chronic obstructive pulmonary disease hospitalization and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 187(7):721–727. doi:10.1164/rccm.201211-2004OC
 19. Zhou Y, Zou Y, Li X, Chen S, Zhao Z, He F, Zou W, Luo Q, Li W, Pan Y, Deng X, Wang X, Qiu R, Liu S, Zheng J, Zhong N, Ran P (2014) Lung function and incidence of chronic obstructive pulmonary disease after improved cooking fuels and kitchen ventilation: a 9-year prospective cohort study. *PLoS Med* 11(3):e1001621. doi:10.1371/journal.pmed.1001621

20. Assad NA, Balmes J, Mehta S, Cheema U, Sood A (2015) Chronic obstructive pulmonary disease secondary to household air pollution. *Semin Respir Crit Care Med* 36(3):408–421. doi:10.1055/s-0035-1554846
21. Rennard SI, Vestbo J (2006) COPD: the dangerous underestimate of 15%. *Lancet* 367(9518):1216–1219. doi:10.1016/S0140-6736(06)68516-4
22. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AMB, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E (2007) International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 370(9589):741–750. doi:10.1016/S0140-6736(07)61377-4
23. Landis SH, Muellerova H, Mannino DM, Menezes AM, Han MK, van der Molen T, Ichinose M, Aisanov Z, Oh Y-M, Davis KJ (2014) Continuing to Confront COPD International Patient Survey: methods, COPD prevalence, and disease burden in 2012-2013. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 9:597–611. doi:10.2147/COPD.S61854
24. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, Chapman HA, Carey V, Campbell EJ, Denish P, Silverman RA, Celedon JC, Reilly JJ, Ginns LC, Speizer FE (2000) Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 162(6):2152–2158. doi:10.1164/ajrccm.162.6.2003112
25. Foreman MG, Zhang L, Murphy J, Hansel NN, Make B, Hokanson JE, Washko G, Regan EA, Crapo JD, Silverman EK, DeMeo DL (2011) Early-onset chronic obstructive pulmonary disease is associated with female sex, maternal factors, and African American race in the COPDGene Study. *Am J Respir Crit Care Med* 184(4):414–420. doi:10.1164/rccm.201011-1928OC
26. Stoller JK, Aboussouan LS (2005) Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 365(9478):2225–2236. doi:10.1016/S0140-6736(05)66781-5
27. Janus ED, Phillips NT, Carrell RW (1985) Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 1(8421):152–154
28. Saetta M, Turato G, Luppi F. Inflammation in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.
29. MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC (1989) The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med* 321(14):924–928. doi:10.1056/NEJM198910053211402

30. Yoshida T, Tudor RM (2007) Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev* 87(3):1047–1082. doi:10.1152/physrev.00048.2006
31. Hogg JC, Timens W (2009) The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol* 4:435–459. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092145
32. Barnes PJ (2016) Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 138(1):16–27. doi:10.1016/j.jaci.2016.05.011
33. Freeman CM, Han MK, Martinez FJ, Murray S, Liu LX, Chensue SW, Polak TJ, Sonstein J, Todt JC, Ames TM, Arenberg DA, Meldrum CA, Getty C, McCloskey L, Curtis JL (2010) Cytotoxic potential of lung CD8(+) T cells increases with chronic obstructive pulmonary disease severity and with in vitro stimulation by IL-18 or IL-15. *J Immunol* 184(11):6504–6513. doi:10.4049/jimmunol.1000006
34. Domej W, Oettl K, Renner W (2014) Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 9:1207–1224. doi:10.2147/COPD.S51226
35. Stockley RA (1999) Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med* 160(5 Pt 2):S49-52. doi:10.1164/ajrccm.160.supplement_1.13
36. Barnes PJ (2014) Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* 35(1):71–86. doi:10.1016/j.ccm.2013.10.004
37. Chung A, Tai H, Coulthard T, Wang R, Wright JL (2006) Cigarette smoke drives small airway remodeling by induction of growth factors in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med* 174(12):1327–1334. doi:10.1164/rccm.200605-585OC
38. Rennard SI, Wachenfeldt Kv (2011) Rationale and emerging approaches for targeting lung repair and regeneration in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 8(4):368–375. doi:10.1513/pats.201102-019RM
39. McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, Seyednejad N, Elliott WM, Sanchez PG, Wright AC, Gefter WB, Litzky L, Coxson HO, Pare PD, Sin DD, Pierce RA, Woods JC, McWilliams AM, Mayo JR, Lam SC, Cooper JD, Hogg JC (2011) Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 365(17):1567–1575. doi:10.1056/NEJMoa1106955
40. Hogg JC (2004) Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364(9435):709–721. doi:10.1016/S0140-6736(04)16900-6

41. Magnussen H, Watz H (2009) Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma: relation with comorbidities. *Proc Am Thorac Soc* 6(8):648–651. doi:10.1513/pats.200906-053DP
42. Fabbri LM, Rabe KF (2007) From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? *Lancet* 370(9589):797–799. doi:10.1016/S0140-6736(07)61383-X
43. Miller J, Edwards LD, Agusti A, Bakke P, Calverley PMA, Celli B, Coxson HO, Crim C, Lomas DA, Miller BE, Rennard S, Silverman EK, Tal-Singer R, Vestbo J, Wouters E, Yates JC, MacNee W (2013) Comorbidity, systemic inflammation and outcomes in the ECLIPSE cohort. *Respir Med* 107(9):1376–1384. doi:10.1016/j.rmed.2013.05.001
44. O'Donnell DE, Neder JA, Elbehairy AF (2016) Physiological impairment in mild COPD. *Respirology* 21(2):211–223. doi:10.1111/resp.12619
45. Haehling S von, Anker SD (2010) Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 1(1):1–5. doi:10.1007/s13539-010-0002-6
46. Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF (1993) Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis* 147(5):1151–1156. doi:10.1164/ajrccm/147.5.1151
47. Kessler R, Partridge MR, Miravittles M, Cazzola M, Vogelmeier C, Leynaud D, Ostinelli J (2011) Symptom variability in patients with severe COPD: a pan-European cross-sectional study. *Eur Respir J* 37(2):264–272. doi:10.1183/09031936.00051110
48. Espinosa de los Monteros MJ, Pena C, Soto Hurtado EJ, Jareno J, Miravittles M (2012) Variability of respiratory symptoms in severe COPD. *Arch Bronconeumol* 48(1):3–7. doi:10.1016/j.arbres.2011.07.004
49. Partridge MR, Karlsson N, Small IR (2009) Patient insight into the impact of chronic obstructive pulmonary disease in the morning: an internet survey. *Curr Med Res Opin* 25(8):2043–2048. doi:10.1185/03007990903103006
50. Wedzicha JA, Seemungal TAR (2007) COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet* 370(9589):786–796. doi:10.1016/S0140-6736(07)61382-8
51. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA (1998) Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 157(5 Pt 1):1418–1422. doi:10.1164/ajrccm.157.5.9709032

52. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Garau J, Huchon G, Ieven M, Ortqvist A, Schaberg T, Torres A, van der Heijden G, Read R, Verheij TJM (2011) Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections--full version. *Clin Microbiol Infect* 17 Suppl 6:E1-59. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03672.x
53. Montes de Oca M, Perez-Padilla R, Talamo C, Halbert RJ, Moreno D, Lopez MV, Muino A, Jose Roberto BJ, Valdivia G, Pertuze J, Ana Maria BM (2010) Acute bronchodilator responsiveness in subjects with and without airflow obstruction in five Latin American cities: the PLATINO study. *Pulm Pharmacol Ther* 23(1):29–35. doi:10.1016/j.pupt.2009.09.005
54. Woodruff PG, Barr RG, Bleecker E, Christenson SA, Couper D, Curtis JL, Gouskova NA, Hansel NN, Hoffman EA, Kanner RE, Kleerup E, Lazarus SC, Martinez FJ, Paine R3, Renard S, Tashkin DP, Han MK (2016) Clinical Significance of Symptoms in Smokers with Preserved Pulmonary Function. *N Engl J Med* 374(19):1811–1821. doi:10.1056/NEJMoa1505971
55. Regan EA, Lynch DA, Curran-Everett D, Curtis JL, Austin JHM, Grenier PA, Kauczor H-U, Bailey WC, DeMeo DL, Casaburi RH, Friedman P, van Beek EJR, Hokanson JE, Bowler RP, Beaty TH, Washko GR, Han MK, Kim V, Kim SS, Yagihashi K, Washington L, McEvoy CE, Tanner C, Mannino DM, Make BJ, Silverman EK, Crapo JD (2015) Clinical and Radiologic Disease in Smokers With Normal Spirometry. *JAMA Intern Med* 175(9):1539–1549. doi:10.1001/jamainternmed.2015.2735
56. <https://www.mrc.ac.uk/research/facilities-and-resources-for-researchers/mrc-scales/mrc-dyspnoea-scale-mrc-breathlessness-scale/>
57. Sundh J, Janson C, Lisspers K, Stallberg B, Montgomery S (2012) The Dyspnoea, Obstruction, Smoking, Exacerbation (DOSE) index is predictive of mortality in COPD. *Prim Care Respir J* 21(3):295–301. doi:10.4104/pcrj.2012.00054
58. Nishimura K, Izumi T, Tsukino M, Oga T (2002) Dyspnea is a better predictor of 5-year survival than airway obstruction in patients with COPD. *Chest* 121(5):1434–1440
59. Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen W-H, Kline Leidy N (2009) Development and first validation of the COPD Assessment Test. *Eur Respir J* 34(3):648–654. doi:10.1183/09031936.00102509
60. http://www.catestonline.org/english/index_German.htm

61. Poole PJ, Chacko E, Wood-Baker RWB, Cates CJ (2006) Influenza vaccine for patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD002733. doi:10.1002/14651858.CD002733.pub2
62. Haczku A (2012) The dendritic cell niche in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 13:80. doi:10.1186/1465-9921-13-80
63. Langerhans P(1) (1868) Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch.* 44,325–337
64. Steinman RM, Cohn ZA (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137(5):1142–1162
65. Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91(5):661–672
66. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404(6774):193–197. doi:10.1038/35004599
67. Schlenner SM, Madan V, Busch K, Tietz A, Laufle C, Costa C, Blum C, Fehling HJ, Rodewald H-R (2010) Fate mapping reveals separate origins of T cells and myeloid lineages in the thymus. *Immunity* 32(3):426–436. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.005
68. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE (2010) Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* 11(7):585–593. doi:10.1038/ni.1889
69. A. Rad (2006) Hematopoiesis (human) diagram. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hematopoiesis_\(human\)_diagram.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hematopoiesis_(human)_diagram.png)
70. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, Chu F-F, Randolph GJ, Rudensky AY, Nussenzweig M (2009) In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324(5925):392–397. doi:10.1126/science.1170540
71. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116(16):e74-80. doi:10.1182/blood-2010-02-258558
72. Zhou H, Wu L (2017) The development and function of dendritic cell populations and their regulation by miRNAs. *Protein Cell*. doi:10.1007/s13238-017-0398-2

73. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284(5421):1835–1837
74. Le Page C, Genin P, Baines MG, Hiscott J (2000) Interferon activation and innate immunity. *Rev Immunogenet* 2(3):374–386
75. Tough DF, Borrow P, Sprent J (1996) Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* 272(5270):1947–1950
76. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J (2001) BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 194(12):1823–1834
77. Chehimi J, Starr SE, Kawashima H, Miller DS, Trinchieri G, Perussia B, Bandyopadhyay S (1989) Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood. *Immunology* 68(4):486–490
78. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ (1997) The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185(6):1101–1111
79. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Briere F, Trinchieri G (2001) Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2(12):1144–1150. doi:10.1038/ni736
80. Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Proietto A, Broeke T ten, Matsuki Y, Mount AM, Belz GT, O'Keeffe M, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Stoorvogel W, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA (2008) Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 9(11):1244–1252. doi:10.1038/ni.1665
81. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5(12):953–964. doi:10.1038/nri1733
82. Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C (2005) Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* 17(4):313–318. doi:10.1016/j.smim.2005.05.013

83. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, Kalchenko V, Geissmann F, Jung S (2007) Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 204(1):171–180. doi:10.1084/jem.20061011
84. Landsman L, Varol C, Jung S (2007) Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol* 178(4):2000–2007
85. Leon B, Ardavin C (2008) Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol* 86(4):320–324. doi:10.1038/icb.2008.14
86. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2(10):947–950. doi:10.1038/ni712
87. Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2(8):675–680. doi:10.1038/90609
88. Kapsenberg ML (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3(12):984–993. doi:10.1038/nri1246
89. West MA, Wallin RPA, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren H-G, Prescott AR, Watts C (2004) Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 305(5687):1153–1157. doi:10.1126/science.1099153
90. Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM (1996) Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 157(2):541–548
91. Bajtay Z, Csomor E, Sandor N, Erdei A (2006) Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunol Lett* 104(1-2):46–52. doi:10.1016/j.imlet.2005.11.023
92. Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271–296. doi:10.1146/annurev.iy.09.040191.001415
93. Forster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A (2008) CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 8(5):362–371. doi:10.1038/nri2297
94. Haessler U, Pisano M, Wu M, Swartz MA (2011) Dendritic cell chemotaxis in 3D under defined chemokine gradients reveals differential response to ligands CCL21 and CCL19. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(14):5614–5619. doi:10.1073/pnas.1014920108
95. Mildner A, Jung S (2014) Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 40(5):642–656. doi:10.1016/j.immuni.2014.04.016

96. Steinman RM, Witmer MD (1978) Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(10):5132–5136
97. Wykes M, Pombo A, Jenkins C, MacPherson GG (1998) Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol* 161(3):1313–1319
98. Curtsinger JM, Mescher MF (2010) Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 22(3):333–340. doi:10.1016/j.coi.2010.02.013
99. Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML (1999) T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20(12):561–567
100. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, van Kooten C, Durand I, Banchereau J (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180(4):1263–1272
101. Behrens G, Li M, Smith CM, Belz GT, Mintern J, Carbone FR, Heath WR (2004) Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol Cell Biol* 82(1):84–90. doi:10.1111/j.1440-1711.2004.01211.x
102. Amigorena S (2002) Fcγ Receptors and Cross-Presentation in Dendritic Cells. *J Exp Med* 195(1):F1-F3. doi:10.1084/jem.20011925
103. Alkhattabi N, Todd I, Negm O, Tighe PJ, Fairclough LC (2018) Tobacco smoke and nicotine suppress expression of activating signaling molecules in human dendritic cells. *Toxicol Lett* 299:40–46. doi:10.1016/j.toxlet.2018.09.002
104. Bratke K, Klug M, Bier A, Julius P, Kuepper M, Virchow JC, Lommatzsch M (2008) Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(6):655–660. doi:10.1165/rcmb.2007-0400OC
105. Demedts IK, Bracke KR, van Pottelberge G, Testelmans D, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG (2007) Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 175(10):998–1005. doi:10.1164/rccm.200608-1113OC
106. Hashimoto M, Yanagisawa H, Minagawa S, Sen D, Goodsell A, Ma R, Moermans C, McKnelly KJ, Baron JL, Krummel MF, Nishimura SL (2015) A critical role for dendritic cells in the evolution of IL-1β-mediated murine airway disease. *J Immunol* 194(8):3962–3969. doi:10.4049/jimmunol.1403043

107. Brusselle GG, Demoor T, Bracke KR, Brandsma C-A, Timens W (2009) Lymphoid follicles in (very) severe COPD: beneficial or harmful? *Eur Respir J* 34(1):219–230. doi:10.1183/09031936.00150208
108. Kelsen SG, Aksoy MO, Georgy M, Hershman R, Ji R, Li X, Hurford M, Solomides C, Chatila W, Kim V (2009) Lymphoid follicle cells in chronic obstructive pulmonary disease overexpress the chemokine receptor CXCR3. *Am J Respir Crit Care Med* 179(9):799–805. doi:10.1164/rccm.200807-1089OC
109. van Pottelberge GR, Bracke KR, van den Broeck S, Reinartz SM, van Drunen CM, Wouters EF, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG (2010) Plasmacytoid dendritic cells in pulmonary lymphoid follicles of patients with COPD. *Eur Respir J* 36(4):781–791. doi:10.1183/09031936.00140409
110. Mori M, Andersson CK, Svedberg KA, Glader P, Bergqvist A, Shikhagaie M, Lofdahl C-G, Erjefalt JS (2013) Appearance of remodelled and dendritic cell-rich alveolar-lymphoid interfaces provides a structural basis for increased alveolar antigen uptake in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 68(6):521–531. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-202879
111. Stoll P, Ulrich M, Bratke K, Garbe K, Virchow JC, Lommatzsch M (2015) Imbalance of dendritic cell co-stimulation in COPD. *Respir Res* 16:19. doi:10.1186/s12931-015-0174-x
112. Stoll P, Heinz A-S, Bratke K, Bier A, Garbe K, Kuepper M, Virchow JC, Lommatzsch M (2014) Impact of smoking on dendritic cell phenotypes in the airway lumen of patients with COPD. *Respir Res* 15:48. doi:10.1186/1465-9921-15-48
113. Arden J, Mullinax F, Waller M (1967) Immunoglobulin levels in rheumatoid arthritis: comparison with rheumatoid factor titers, clinical stage and disease duration. *Arthritis Rheum* 10(3):228–234
114. Lin G-g, Li J-m (2009) IgG subclass serum levels in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol* 28(11):1315–1318. doi:10.1007/s10067-009-1224-x
115. Rai T, Wu X, Shen B (2015) Frequency and risk factors of low immunoglobulin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 3(2):115–121. doi:10.1093/gastro/gou082
116. Janeway CA, Travers P, Haufier-Siller I (1995) *Immunologie. Spektrum-Lehrbuch*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg
117. Peakman M, Vergani D (1997) *Basic and clinical immunology*. Churchill Livingstone, New York

118. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S (1999) Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189(2):371–380
119. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW (1999) The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fcγ receptor II. *J Exp Med* 190(4):585–590
120. Kim Y, Ryu J, Ryu MS, Lim S, Han KO, Lim IK, Han KH (2014) C-reactive protein induces G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in monocytes through the upregulation of B-cell translocation gene 2 expression. *FEBS Lett* 588(4):625–631. doi:10.1016/j.febslet.2014.01.008
121. Devaraj S, Du Clos TW, Jialal I (2005) Binding and internalization of C-reactive protein by Fcγ receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(7):1359–1363. doi:10.1161/01.ATV.0000168573.10844.ae
122. Ravetch JV, Bolland S (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19:275–290. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.275
123. Nimmerjahn F, Ravetch JV (2008) Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8(1):34–47. doi:10.1038/nri2206
124. Garbe K, Bratke K, Wagner S, Virchow JC, Lommatzsch M (2012) Plasmacytoid dendritic cells and their Toll-like receptor 9 expression selectively decrease with age. *Hum Immunol* 73(5):493–497. doi:10.1016/j.humimm.2012.02.007
125. Grutzkau A, Radbruch A (2010) Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry A* 77(7):643–647. doi:10.1002/cyto.a.20918
126. Geiselhart A, Neu S, Buchholz F, Lang P, Niethammer D, Handgretinger R (1996-1997) Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting. *Nat Immun* 15(5):227–233
127. <http://www.miltenyibiotec.com/myeloid-dendritic-cell-isolation-kit-human>
128. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11(2):231–238. doi:10.1002/cyto.990110203

129. Bratke K, Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Kleine H-D, Luttmann W, Christian Virchow J (2007) Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge. *Thorax* 62(2):168–175. doi:10.1136/thx.2006.067793
130. Lommatzsch M, Bratke K, Knappe T, Bier A, Dreschler K, Kuepper M, Stoll P, Julius P, Virchow JC (2010) Acute effects of tobacco smoke on human airway dendritic cells in vivo. *Eur Respir J* 35(5):1130–1136. doi:10.1183/09031936.00090109
131. Dreschler K, Bratke K, Petermann S, Bier A, Thamm P, Kuepper M, Virchow JC, Lommatzsch M (2011) Impact of immunotherapy on blood dendritic cells in patients with Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 127(2):487-494.e1-3. doi:10.1016/j.jaci.2010.12.003
132. Dispenzieri A, Gertz MA, Therneau TM, Kyle RA (2001) Retrospective cohort study of 148 patients with polyclonal gammopathy. *Mayo Clin Proc* 76(5):476–487. doi:10.4065/76.5.476
133. R. A. Patnode SERUM IMMUNOGLOBULIN LEVELS IN SARCOIDOSIS
134. Liu Y, Li J (2011) Preferentially immunoglobulin (IgG) subclasses production in primary Sjogren's syndrome patients. *Clin Chem Lab Med* 50(2):345–349. doi:10.1515/CCLM.2011.771
135. Horton N, Wu X, Philpott J, Garber A, Achkar J-P, Brzezinski A, Lashner BA, Shen B (2016) Impact of Low Immunoglobulin G Levels on Disease Outcomes in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis Sci* 61(11):3270–3277. doi:10.1007/s10620-016-4294-z
136. Birring SS, Pavord ID (2011) COPD: an autoimmune disease? *Eur Respir J* 38(2):484. doi:10.1183/09031936.00044511
137. Cosio MG, Saetta M, Agusti A (2009) Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 360(23):2445–2454. doi:10.1056/NEJMra0804752
138. Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette BC, Marshak-Rothstein A, Chen J (2000) Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3):1184–1189
139. Lo MS, Zurakowski D, Son MBF, Sundel RP (2013) Hypergammaglobulinemia in the pediatric population as a marker for underlying autoimmune disease: a retrospective cohort study. *Pediatr Rheumatol Online J* 11(1):42. doi:10.1186/1546-0096-11-42

140. Hunninghake GW, Crystal RG (1981) Mechanisms of hypergammaglobulinemia in pulmonary sarcoidosis. Site of increased antibody production and role of T lymphocytes. *J Clin Invest* 67(1):86–92. doi:10.1172/JCI110036
141. Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LE, Pilewski JM, Stoner MW, Csizmadia E, Zhang Y, Sciurba FC, Duncan SR (2008) Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 177(2):156–163. doi:10.1164/rccm.200701-014OC
142. Boehme JD, Stegemann-Koniszewski S, Autengruber A, Peters N, Wissing J, Jansch L, Jeron A, Bruder D (2017) Chronic lung inflammation primes humoral immunity and augments antipneumococcal resistance. *Sci Rep* 7(1):4972. doi:10.1038/s41598-017-05212-4
143. Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, Campos J, Rey J, Meijide LM, Fernandez-Merino C, Vidal C (2008) Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol* 151(1):42–50. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03545.x
144. Kruger K, Dischereit G, Seimetz M, Wilhelm J, Weissmann N, Mooren FC (2015) Time course of cigarette smoke-induced changes of systemic inflammation and muscle structure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309(2):L119–28. doi:10.1152/ajplung.00074.2015
145. Fernandez JAF, Prats JM, Artero JVM, Mora AC, Farinas AV, Espinal A, Mendez JAG (2012) Systemic inflammation in 222,841 healthy employed smokers and nonsmokers: white blood cell count and relationship to spirometry. *Tob Induc Dis* 10(1):7. doi:10.1186/1617-9625-10-7
146. O'Keeffe S, Gzel A, Drury R, Cullina M, Grealley J, Finnegan P (1991) Immunoglobulin G subclasses and spirometry in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 4(8):932–936
147. McCullagh BN, Comellas AP, Ballas ZK, Newell JD, JR, Zimmerman MB, Azar AE (2017) Antibody deficiency in patients with frequent exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *PLoS One* 12(2):e0172437. doi:10.1371/journal.pone.0172437

148. Chauhan S, Gupta MK, Goyal A, Dasgupta DJ (1990) Alterations in immunoglobulin & complement levels in chronic obstructive pulmonary disease. *Indian J Med Res* 92:241–245
149. Morgan AW, Barrett JH, Griffiths B, Subramanian D, Robinson JI, Keyte VH, Ali M, Jones EA, Old RW, Ponchel F, Boylston AW, Situnayake RD, Markham AF, Emery P, Isaacs JD (2006) Analysis of Fcγ receptor haplotypes in rheumatoid arthritis: FCGR3A remains a major susceptibility gene at this locus, with an additional contribution from FCGR3B. *Arthritis Res Ther* 8(1):R5. doi:10.1186/ar1847
150. Harley JB, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA et al (2008) Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 40(2):204–210. doi:10.1038/ng.81
151. McGovern DPB, Gardet A, Torkvist L et al (2010) Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet* 42(4):332–337. doi:10.1038/ng.549
152. Lessard CJ, Li H, Adrianto I et al (2013) Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjogren's syndrome. *Nat Genet* 45(11):1284–1292. doi:10.1038/ng.2792
153. Daeron M, Nimmerjahn F (Hrsg) (2014) Fc Receptors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Bd 382. Springer International Publishing, Cham, s.l.
154. Ran M, Teillaud JL, Fridman WH, Frenkel H, Halachmi E, Katz B, Gips M, Shlomo Y, Barzilay J, Witz IP (1988) Increased expression of Fc γ receptor in cancer patients and tumor bearing mice. *Mol Immunol* 25(11):1159–1167
155. Capsoni F, Minonzio F, Ongari AM, Colombo G, Rizzardi GP, Bonara P, D'Arminio-Monforte A, Zanussi C (1992) Increased expression of IgG Fc receptor type I on neutrophils and monocytes from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 90(2):175–180
156. Blom AB, Radstake TRDJ, Holthuysen AEM, Sloetjes AW, Pesman GJ, Sweep FGJ, van de Loo FAJ, Joosten LAB, Barrera P, van Lent PLEM, van den Berg WB (2003) Increased expression of Fcγ receptors II and III on macrophages of rheumatoid arthritis patients results in higher production of tumor necrosis factor α and matrix metalloproteinase. *Arthritis Rheum* 48(4):1002–1014. doi:10.1002/art.10871

157. Devaraj S, Chen X, Adams-Huet B, Jialal I (2013) Increased expression of Fc-gamma receptors on monocytes in patients with nascent metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 98(9):E1510-5. doi:10.1210/jc.2013-2112
158. Stoll P, Bahker A, Ulrich M, Bratke K, Garbe K, Christian Virchow J, Lommatzsch M (2016) The dendritic cell high-affinity IgE receptor is overexpressed in both asthma and severe COPD. *Clin Exp Allergy* 46(4):575–583. doi:10.1111/cea.12664
159. Lunnon K, Teeling JL, Tutt AL, Cragg MS, Glennie MJ, Perry VH (2011) Systemic inflammation modulates Fc receptor expression on microglia during chronic neurodegeneration. *J Immunol* 186(12):7215–7224. doi:10.4049/jimmunol.0903833
160. Vogelpoel LTC, Baeten DLP, Jong EC de, den Dunnen J (2015) Control of cytokine production by human fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. *Front Immunol* 6:79. doi:10.3389/fimmu.2015.00079
161. Kim JT, Schimming AW, Kita H (1999) Ligation of Fc gamma RII (CD32) pivotally regulates survival of human eosinophils. *J Immunol* 162(7):4253–4259
162. Boruchov AM, Heller G, Veri M-C, Bonvini E, Ravetch JV, Young JW (2005) Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest* 115(10):2914–2923. doi:10.1172/JCI24772
163. Banki Z, Kacani L, Mullauer B, Wilflingseder D, Obermoser G, Niederegger H, Schenach H, Sprinzl GM, Sepp N, Erdei A, Dierich MP, Stoiber H (2003) Cross-linking of CD32 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells via NF-kappa B signaling pathway. *J Immunol* 170(8):3963–3970
164. Kawamura K, Iyonaga K, Ichiyasu H, Nagano J, Suga M, Sasaki Y (2005) Differentiation, maturation, and survival of dendritic cells by osteopontin regulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 12(1):206–212. doi:10.1128/CDLI.12.1.206-212.2005
165. Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A (2002) CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol* 23(6):273–275
166. Agustí A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, Vestbo J, Lomas DA, Calverley PMA, Wouters E, Crim C, Yates JC, Silverman EK, Coxson HO, Bakke P, Mayer RJ, Celli B (2012) Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS One* 7(5):e37483. doi:10.1371/journal.pone.0037483

167. Dreschler K, Bratke K, Petermann S, Thamm P, Kuepper M, Virchow JC, Lommatzsch M (2012) Altered phenotype of blood dendritic cells in patients with acute pneumonia. *Respiration* 83(3):209–217. doi:10.1159/000328406
168. Das UN (2011) *Molecular Basis of Health and Disease*. Springer Science+Business Media B.V, Dordrecht
169. Filep J, Foldes-Filep E (1989) Effects of C-reactive protein on human neutrophil granulocytes challenged with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and platelet-activating factor. *Life Sci* 44(8):517–524
170. Shephard EG, Anderson R, Rosen O, Myer MS, Fridkin M, Strachan AF, Beer FC de (1990) Peptides generated from C-reactive protein by a neutrophil membrane protease. Amino acid sequence and effects of peptides on neutrophil oxidative metabolism and chemotaxis. *J Immunol* 145(5):1469–1476
171. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Filep JG (1997) Prevention of In vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest* 100(3):522–529. doi:10.1172/JCI119561

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
ATS	American Thoracic Society
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen
BMI	Body Mass Index
BOLD	Burden of Obstructive Lung Disease
C	COPD-Patienten
CAT	COPD Assessment Test
CCL	Chemokin-Ligand
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungscluster
CD40L	CD40-Ligand
cDC	Konventionelle dendritische Zellen
CDP	Common DC Progenitors
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CLP	Common Lymphoid Progenitors
CMP	Common Myeloid Progenitors
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease, chronisch entzündliche Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
DALY	Disability Adjusted Life Years
DC	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERS	European Respiratory Society
Fab	fragment antigen binding
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fetales Kälberserum
Fc _γ R	Fc _(gamma) -Rezeptor
FEV1	Einsekundenkapazität
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - antigen D Related
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ICS	Inhalatives Kortikosteroid
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IQA	Interquartilenabstand
IUIS	Internationale Union immunologischer Gesellschaften
IVC	Inspiratorische Vitalkapazität

kD	Kilodalton
LABA	Langwirksames Beta-2-Sympathomimetikum
LAMA	Langwirksamer Muskarinantagonist
Lin1	Anti-human Lineage Cocktail 1
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting, magnetische Zellseparation
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCV	Mean Corpuscular Volume
mDC	Myeloide dendritische Zellen
MEF 50	Mittlere Atemstromstärke bei 50% der forcierten Vitalkapazität
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHCp	Major Histocompatibility Complex - Peptid
mMRC	Modified Medical Research Council
moDC	Von Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen
n	Anzahl
N	Nieraucher
n.a.	Not available/applicable
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OCS	Orales Kortikosteroid
OX40L	OX40-Ligand
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells, periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate-buffered Saline
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PRR	Pattern Recognition Receptor, Mustererkennungsrezeptor
PY	Pack Year, Packungsjahr
R	Raucher
RA	Rheumatoide Arthritis
RV	Residualvolumen
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SS	Sjögren-Syndrom
SSC	Sideward Scatter, Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
Tc-Zelle	Zytotoxische T-Zelle
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLC	Totale Lungenkapazität
TLCO	Diffusionskapazität
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg-Zelle	Regulatorische T-Zelle
VA	Alveoläre Ventilation
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	ABCD-Klassifikation der COPD	7
Abb. 1-2:	Stufentherapie bei COPD	8
Abb. 1-3:	Hämatopoese	11
Abb. 2-1:	Prinzip der PBMC-Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation	26
Abb. 2-2:	Beispiel einer Reinheitskontrolle nach magnetischer Zellseparation	32
Abb. 2-3:	Beispiele für das Gating der mDC im Blut	38
Abb. 2-4:	Oberflächenmarker auf dendritischen Zellen	39
Abb. 2-5:	Oberflächenmarker auf kultivierten, dendritischen Zellen	40
Abb. 2-6:	Beispiel für ein Boxplot-Diagramm	41
Abb. 3-1:	Verteilung des Oberflächenmarkers CD32 in den untersuchten Gruppen	46
Abb. 3-2:	Verteilung des Oberflächenmarkers CD64 in den untersuchten Gruppen	47
Abb. 3-3:	Korrelation der Serum-IgG ₂ -Konzentration mit der Expression von CD32 auf myeloiden dendritischen Zellen bei Patienten mit COPD	48
Abb. 3-4:	Korrelation der Serum-IgG ₃ -Konzentration mit der Expression von CD32 auf myeloiden dendritischen Zellen bei Patienten mit COPD	49
Abb. 3-5:	CD 80 - Expression der mDC in der Zellkultur	53
Abb. 3-6:	CD 40 - Expression der mDC in der Zellkultur	54
Abb. 3-7:	CD 86 - Expression der mDC in der Zellkultur	55
Abb. 3-8:	CD 83 - Expression der mDC in der Zellkultur	56
Abb. 3-9:	HLA-DR - Expression der mDC in der Zellkultur	57
Abb. 4-1:	Immunhistochemie – Akkumulation von IgG in den Alveolarsepten und kleinen Atemwegen von COPD-Patienten	64
Abb. 4-2:	Regulatorische Funktionen des Immunglobulin-Rezeptors	68
Abb. 4-3:	Hypothese zur Pathogenese der COPD	72

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1:	Schweregrad der Obstruktion bei COPD nach GOLD	6
Tab. 1-2:	Einteilung der Fc _γ -Rezeptoren	19
Tab. 2-1:	Definitionen der erhobenen Lungenfunktionsparameter	22
Tab. 2-2:	Verteilung der entnommenen Blutvolumina	24
Tab. 2-3:	Analysierte Parameter der klinischen Chemie	25
Tab. 2-4:	Stimulationsschema für die Zellkultur	34
Tab. 2-5:	Ansätze für die FACS-Markierungen	37
Tab. 2-6:	Ansätze für die FACS-Markierungen	40
Tab. 3-1:	Anamnestische und anthropometrische Charakteristika der klinischen Studie	43
Tab. 3-2:	Laborchemische und spirometrische Parameter der klinischen Studie	44
Tab. 3-3:	Immunglobulinkonzentrationen im Serum	45
Tab. 3-4:	Oberflächenmarker auf myeloiden dendritischen Zellen	46
Tab. 3-5:	Anamnestische und anthropometrische Charakteristika der Zellkulturstudie	50
Tab. 3-6:	Laborchemische und spirometrische Parameter der Zellkulturstudie	51

8 THESEN

1. Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) zählt zu den führenden, globalen Volkserkrankungen. Sie manifestiert sich in einer chronischen Entzündung der kleinen Atemwege.
2. Dendritische Zellen (DC) übernehmen als antigenpräsentierende Zellen eine Hauptfunktion bei der Regulation der erworbenen Immunantwort. Es gibt zunehmende Hinweise dafür, dass dendritische Zellen an der Pathogenese chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen beteiligt sind.
3. Die Immunglobulin-Rezeptoren CD32 und CD64 spielen eine besondere Rolle in chronisch-entzündlichen Erkrankungen, da sie sowohl als Rezeptoren für IgG als auch CRP fungieren.
4. Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Regulation der Immunglobulin-Rezeptoren auf DC von Patienten mit COPD. Im Blut von COPD-Patienten, Rauchern und Nierauchern wurden sowohl die Immunglobulin-Konzentrationen als auch die Expressionen der Immunglobulin-Rezeptoren auf myeloiden dendritischen Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Zudem wurden in Zellkulturen DC mit Immunglobulinen stimuliert und hinsichtlich resultierender Veränderungen ihrer Reifemarker-Expressionen analysiert.
5. Die Gesamt-IgG- und IgG1-Konzentrationen im Serum von Rauchern und COPD-Patienten zeigten sich im Vergleich zu denen der Nieraucher erniedrigt.
6. Die Expression des Immunglobulin-Rezeptors CD32 auf myeloiden dendritischen Zellen von COPD-Erkrankten war im Vergleich zu den Kontrollgruppen der Nieraucher und Raucher signifikant erhöht.

7. Für die Konzentrationen von IgG2 und IgG3 ergab sich jeweils eine negative Korrelation mit der Expression von CD32 bei COPD-Patienten. Je niedriger die IgG2- bzw. IgG3-Konzentrationen waren, desto ausgeprägter zeigte sich die Expression von CD32.
8. Bezüglich der Stimulierbarkeit der Expression von DC-Reifemarkern durch Immunglobuline konnten keine Unterschiede zwischen den Probandengruppen festgestellt werden.
9. Es wird postuliert, dass eine veränderte Expression des Rezeptors CD32 auf DC sowie dessen Interaktion mit seinen Liganden IgG und CRP eine pathogenetische Rolle bei der COPD spielen. So könnte es durch die Überexpression von CD32 zu einer proinflammatorischen Aktivität der DC kommen, die zur chronischen Entzündung der COPD beiträgt.

9 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Janne Didt
Geburtsdatum/-ort: 11.10.1991 in Neu Kaliß
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulische Ausbildung

1998 – 2002 Johannes-Gillhoff-Schule, Tewswos
2002 – 2010 Gymnasiales Schulzentrum „Fritz Reuter“, Dömitz
07.2010 Allgemeine Hochschulreife [1,2]

Universitäre Ausbildung

10.2010 Immatrikulation für das Studium der Humanmedizin,
Universität Rostock
09.2012 Abschluss des 1. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung [2,0]
10.2015 Abschluss des 2. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung [1,0]
12.2016 Abschluss des 3. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung [2,0]
Gesamtnote: 1,66
05.2017 Approbation als Ärztin, Landesamt für Gesundheit und Soziales
Mecklenburg Vorpommern

Beruflicher Werdegang

10.2017 - heute Assistenzärztin an der Asklepios Klinik Altona, Abteilung für Kardiolo-
gie, Pneumologie und internistische Intensivmedizin
10.2019 – heute Mitglied der Forschungsgruppe der Abteilung für Kardiologie,
Pneumologie und internistische Intensivmedizin der Asklepios Klinik
Altona

10 DANKSAGUNG

Zu Beginn möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Lommatzsch für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses Themas und für seine ausführliche Hilfe bei der Diskussion wissenschaftlicher Fragestellungen herzlich bedanken.

Sehr zu schätzen weiß ich die Zuverlässigkeit und stetige Erreichbarkeit meines Promotionsbetreuers Herrn PD Dr. Paul Stoll. Für seine Unterstützung bei der Auswertung der erhobenen Daten, für die investierte Zeit und viele wertvolle Anregungen, und für die professionelle Anleitung bei der Erstellung dieser Arbeit bin ich ihm überaus dankbar.

Des Weiteren gebührt mein Dank Herrn Dr. Kai Bratke für seine kontinuierliche Hilfestellung im Rahmen aller Fragen, die während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit aufkamen. Darüber hinaus danke ich ihm und Frau Dr. Katarina Garbe für die geduldige Einarbeitung im immunologisch-pneumologischen Labor der Universität Rostock.

Den Mitarbeiterinnen der Funktionsdiagnostik in der pneumologischen Abteilung der Universität Rostock möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit bei der Erhebung der Lungenfunktionswerte danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und auf deren Hilfe ich auch im Rahmen dieser Arbeit stets zählen konnte. Vielen Dank für Eure beispieldlose Unterstützung in jeder Phase meines Lebens.

11 PERSÖNLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und verfasst habe. Ich habe keine Hilfsmittel außer den genannten verwendet.

Janne Didt

Rostock im Januar 2021